



HAL
open science

Synthèse enzymatique de phospholipides structurés riches en DHA

Florence Hubert

► **To cite this version:**

Florence Hubert. Synthèse enzymatique de phospholipides structurés riches en DHA. Biotechnologie. Le Mans Université, 2018. Français. NNT : 2018LEMA1009 . tel-01887172

HAL Id: tel-01887172

<https://theses.hal.science/tel-01887172>

Submitted on 3 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

LE MANS UNIVERSITE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : Biotechnologies

Par

Florence HUBERT

Synthèse enzymatique de phospholipides structurés riches en DHA

Thèse présentée et soutenue à Laval, le 12 juillet 2018
Unité de recherche : EA 2160 Mer, Molécules, Santé
Thèse N° : 2018LEMA1009

Rapporteurs avant soutenance :

Catherine Sarazin
Abdelkarim Abousalham

Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne
Professeur des Universités, Université Lyon 1

Composition du Jury :

Président : Jean-Luc Mouget
Examineurs : Catherine Sarazin
Abdelkarim Abousalham
Dir. de thèse : Françoise Ergon

Professeur des Universités, Le Mans Université
Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne
Professeur des Universités, Université Lyon 1
Professeur des Universités, Le Mans Université

Invité(s)

Céline Loiseau
Laurent Poisson
Gildas Breton
Pierre Sauleau

Maître de Conférences, Le Mans Université
Maître de Conférences, Le Mans Université
Directeur R&D, Polaris-Functional Lipids
Maître de Conférences, Université de Bretagne Sud

« Être surpris, s'étonner, c'est déjà commencer à comprendre »

José Ortega Y Gasset

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, le professeur Françoise Ergan, dont les conseils et les remarques m'ont permis de m'améliorer tout au long de ces années de thèse. La confiance, le temps et les conseils prodigués sur ce travail ont fait de moi une meilleure chercheuse!

Je remercie également Céline Loiseau et Laurent Poisson qui en tant que co-encadrants m'ont apporté de leur temps et de nombreux conseils tout au long de ce travail. J'ai pu trouver auprès d'eux les oreilles nécessaires et les propos rassurants quant à l'avancement de ce travail de thèse.

Je souhaite remercier Abdelkarim Abousalham et Catherine Sarazin pour avoir accepté le travail de rapporteur et Jean-Luc Mouget, Gildas Breton et Pierre Sauleau pour le temps passé à juger ce travail et pour l'attention qu'ils y ont portée.

Je tiens à remercier Martine Côme pour la réalisation des manipulations que nous avons faites en binôme. Ca a été un vrai plaisir de partager ces moments, le sourire aux lèvres. Je n'oublie pas non plus les nombreuses discussions diverses et variées qui ont pu animer notre travail, allant de comment faire un cake au rôle important de l'éducation dans la prise de confiance de l'enfant, nécessaire à faire d'eux des adultes.

Je remercie également toute l'équipe enseignante de l'IUT Génie Biologique de Laval pour les discussions m'ayant permis d'ouvrir mon sens critique au métier d'enseignant. Un merci tout particulier à Françoise Lourdais qui en tant que tutrice m'a donnée les ficelles de ce métier en pointant les difficultés que j'allais rencontrer lors de mes premières expériences.

Merci également à Gaëlle Pencreac'h qui m'a projetée dans ce projet de thèse alors que je n'étais encore qu'une stagiaire. Il fallait que quelqu'un m' imagine en thèse pour que j'entrouvre cette porte. Elle m'a largement aidée à la pousser.

Je remercie également le personnel technique de l'IUT sans qui cet établissement ne tournerait pas rond et qui bien souvent se plie en 4 pour répondre au mieux aux demandes étranges des doctorants.

Je remercie également les stagiaires qui ont travaillé sur ce sujet : Romain, Valérie, Mylène et Erwan. Je tiens également à remercier ceux qui ont travaillé sur d'autres sujets au sein du laboratoire : Alexandre, Nicolas et Justine.

Je ne peux pas passer à côté de mes amis qui, par nos échanges, ont suivi ce travail plutôt d'un point de vue émotionnel. La bande de Quimperlé : Amandine, Guillaume, Aurélien, Pierre, Yohan. Les amis bateaux : Aurélie, Edouard, Christine, Gaëtan, Jean-Bernard, Guillaume et Yann ; ces virées en mer ont toujours été de vraies bouffées d'oxygène et d'iode! Merci également aux amis de la bande de Riec : Marine, Marine (ce n'est pas une erreur), Manu, Inès et Madeline. Et enfin, merci aux amis Lavallois avec qui j'ai passé de nombreuses soirées en début de thèse : Eglantine (oui il nous aura fallu du temps pour se rendre compte qu'on habitait la même ville) ; tout au long de la thèse : Rose-Marie (les repas chez toi me manqueront, c'est des temps que j'ai trouvés agréables) ; et en fin de thèse : Mon petit loukoum et Titou, nos nombreux échanges et la musique que nous avons parfois partagée ont largement allégé cette lourde partie du travail qu'est la rédaction !

Merci également à toute la famille. Il est clair que sans votre concours, je n'en serai pas arrivée là !

Gaston Bachelard a écrit : Le moi s'élève par la grâce du toi. Dans ce long travail, Vous avez été mon toi me permettant de m'élever dans cette carrière professionnelle. Je vous adresse donc un grand MERCI.

Liste des communications et publications

Présentations orales

Congrès international Euro Fed Lipid, Gand, Belgique (18-21)/09/2016

- Enzyme catalyzed acidolysis of microalgal phospholipids to obtain phospholipids rich in DHA and octanoic acid
F.Hubert, L.Poisson, C.Loiseau, F.Ergan

Présentation au Forum Jeune Recherche Le Mans, France 14/11/16

- Synthèse enzymatique de phospholipides structurés à partir de lipides microalgaux

Publications

- Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*

Florence Hubert, Laurent Poisson, Céline Loiseau, Laurent Gauvry, Gaëlle Pencreac'h, Josiane Hérault and Françoise Ergan

Oilseeds & fats Crops and Lipids, 24 (4) D407, 2017

- Fast fatty acid analysis by core-shell reversed-phase liquid chromatography coupled to evaporative light-scattering detector

Florence Hubert, Céline Loiseau, Françoise Ergan, Gaëlle Pencreac'h, Laurent Poisson

Food and Nutrition Sciences, 8,1051-1062, 2017

Poster

- Synthèse enzymatique de phospholipides structurés à partir de lipides microalgaux
 - Forum Jeune Recherche, Le Mans, France 14/11/16
 - Visite du Cérium par Laval Agglomération 01/17

Table des matières

Remerciements	4
Liste des communications et publications	6
Liste des abréviations.....	12
Liste des abréviations des phospholipides.....	13
Liste des illustrations	14
Liste des tableaux	18
Introduction.....	20
I Etude bibliographique.....	23
1 Les acides gras	25
1.1 Généralités	25
1.1.1 Les acides gras essentiels et indispensables	26
1.1.2 L'acide caprylique.....	28
1.2 Rôle des acides gras dans l'organisme.....	29
1.2.1 Source d'énergie.....	29
1.2.2 Rôle structural	30
1.3 L'acide docosahexaénoïque.....	30
1.4 DHA et santé.....	31
1.4.1 Développement	32
1.4.2 Risques associés à la grossesse	33
1.4.3 Fonction visuelle	34
1.4.4 Pathologies et acides gras ω 3	34
1.5 Apports nutritionnels conseillés	39
1.6 Oxydation des acides gras ω 3	40
1.6.1 Mécanismes d'oxydation.....	40
1.6.2 Les antioxydants.....	42
1.7 Les sources d'AGPI.....	43

1.7.1	Les huiles de poisson.....	43
1.7.2	Les crustacés	44
1.7.3	Les organismes unicellulaires	44
1.7.4	Localisation de l'EPA et du DHA dans les classes de lipides	47
2	Les phospholipides	50
2.1	<i>Structure</i>	50
2.1.1	Les glycérophospholipides	50
2.1.2	Les phosphosphingolipides	52
2.2	<i>Composés essentiels des membranes</i>	53
2.3	<i>Applications</i>	54
2.4	<i>Phospholipides et digestion</i>	56
2.5	<i>Biodisponibilité du DHA</i>	57
2.6	<i>Oxydation du DHA</i>	59
2.7	<i>Intérêt physiologique des phospholipides riches en DHA</i>	59
3	Modification enzymatique des lipides.....	60
3.1	<i>Les lipases</i>	61
3.1.1	Structure des lipases	61
3.1.2	Réactions catalysées.....	62
3.1.3	Facteurs influençant les réactions.....	64
3.1.4	Sélectivité des lipases.....	67
3.1.5	Applications des lipases	71
3.2	<i>Les phospholipases</i>	72
3.3	<i>Synthèse de phospholipides structurés</i>	73
3.3.1	Modification par des phospholipases	75
3.3.2	Modification par des lipases.....	80
3.3.3	Migration des chaînes acylées	86
4	Objectifs de la thèse.....	87
	II Matériels et méthodes	89
1	Matériels.....	91

1.1	<i>Biocatalyseurs</i>	91
1.2	<i>Réactifs et solvants</i>	92
1.3	<i>Microalgue utilisée</i>	93
2	Plan d'expériences	94
3	Traitement et analyses des lipides	97
3.1	<i>Extraction des lipides microalgaux</i>	97
3.1.1	Choix du mélange de solvant pour l'extraction	97
3.1.2	Optimisation de la méthode d'extraction aux ultrasons	97
3.2	<i>Dosage colorimétrique des phospholipides</i>	99
3.2.1	Méthode au molybdate d'ammonium	99
3.2.2	Méthode au ferrothiocyanate d'ammonium	100
3.3	<i>Séparation des classes de lipides</i>	100
3.4	<i>Analyses par chromatographie sur couche mince</i>	101
3.4.1	Suivi des réactions d'estérification	101
3.4.2	Analyse des fractions lipidiques microalgales	102
3.4.3	Révélation	102
3.5	<i>Analyses par chromatographie liquide haute performance</i>	102
3.5.1	Préparation des échantillons	103
3.5.2	Suivi de la réaction d'acidolyse	104
3.5.3	Suivi de la réaction d'estérification	106
3.5.4	UHPLC-MS des produits de l'estérification	107
3.6	<i>Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras issus des fractions lipidiques de <i>Tisochrysis lutea</i></i>	109
3.6.1	Préparation des échantillons	109
3.6.2	CPG des esters méthyliques des fractions lipidiques de <i>Tisochrysis lutea</i>	109
4	Réactions enzymatiques	110
4.1	<i>Mesure de l'activité de l'eau</i>	110
4.2	<i>Réaction d'acidolyse entre la phosphatidylcholine de tournesol et l'acide caprylique</i>	110
4.2.1	Criblage enzymatique	111
4.2.2	Mise en place d'un plan d'expériences	112

4.3	<i>Réaction d'estérification</i>	113
III Résultats et discussions		115
1	Développement des méthodes analytiques	117
1.1	<i>Suivi de l'acidolyse par HPLC</i>	117
1.1.1	Optimisation des paramètres du DEDL.....	117
1.1.2	Optimisation de la température de la colonne	121
1.1.3	Séparation des acides gras	122
1.1.4	Validation de méthode	123
1.1.5	Elution des phospholipides.....	127
1.2	<i>Détermination des espèces moléculaires obtenues par estérification</i>	128
1.2.1	Purification des espèces moléculaires de phospholipides	130
1.2.2	Caractérisation de la PC DHA-C8.....	132
1.2.3	Caractérisation de la LPC DHA	133
1.2.4	Suivi de la réaction d'estérification.....	134
2	Traitement de la biomasse	137
2.1	<i>Dosage des phospholipides</i>	137
2.1.1	Méthode au molybdate d'ammonium.....	137
2.1.2	Méthode au ferrothiocyanate d'ammonium	138
2.2	<i>Extraction</i>	138
2.2.1	Choix de la méthode d'extraction.....	138
2.2.2	Optimisation de la sonication des extraits lipidiques par la méthodologie de surface de réponse	139
2.2.3	Analyse du plan d'expériences à surface de réponse et détermination des facteurs optimaux d'extraction de phospholipides microalgaux	144
2.3	<i>Répartition du DHA entre les classes de lipides</i>	146
2.3.1	Séparation des classes de lipides de <i>Tisochrysis lutea</i>	146
2.3.2	Profil en acides gras des lipides de <i>Tisochrysis lutea</i>	147
3	Synthèse enzymatique de phospholipides structurés	149
3.1	<i>Acidolyse des phosphatidylcholines de tournesol</i>	149
3.1.1	Faisabilité de la réaction et choix de l'enzyme.....	150

3.1.2	Mise en place du plan d'expériences : définition des facteurs et du domaine expérimental	151
3.1.3	Plan d'expériences.....	159
3.1.4	Acidolyse des phospholipides microalgaux	168
3.2	<i>Synthèse de PC DHA-C8 par estérification.....</i>	<i>169</i>
3.2.1	Criblage enzymatique.....	171
3.2.2	Etude du rapport molaire.....	173
3.2.3	Quantité d'enzyme	176
3.2.4	Etude de l'effet du vide	179
3.2.5	Etude de la température.....	181
	Conclusion et perspectives.....	187
	Références.....	193
	Annexe I.....	209
	Annexe II.....	219

Liste des abréviations

AG : Acide gras	LOQ : Limit of Quantification
AGCM : Acide Gras à Chaîne Moyenne	PGE2 : Prostaglandine E2
AGPI : Acide Gras PolyInsaturé	PGE3 : Prostaglandine E3
ALA : Acide α -linoléique	PLA1 : Phospholipase A1
a_w : Activité de l'eau	PLA2 : Phospholipase A2
BF₃ : Trifluorure de Bore	PLB : Phospholipase B
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	PLC : Phospholipase C
CLA : Acide Linoléique Conjugué	PLD : Phospholipase D
COX : Cyclooxygénase	SLM : Standard Liter per Minute
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse	TFA : Acide trifluoroacétique
CV : Coefficient de Variation	t_r : Temps de rétention
DEDL : Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière	UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance
DHA : Acide Docosahexaénoïque 4z, 7z, 10z, 13z, 16z, 19z	UV : Ultra Violet
EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique	Vi : Vitesse initiale
EPA : Acide Eicosapentaénoïque	VLDL : Very Low Density Lipoprotein
ESI : Ionisation par electronébuliseur	
GPC : Glycérophosphocholine	
HDL : High Density Lipoprotein	
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance	
ICH : International Conference on Harmonisation	
IMMM : Institut des Molécules et Matériaux du Mans	
IUN : Unité d'Interestérisation	
LC/MS : Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrophotometry	
LDL : Low Density Lipoprotein	
LOD : Limit of Detection	

Liste des abréviations des phospholipides

Les positions sur la chaîne glycérol des acyles ne sont pas toujours indiquées car celles-ci ne sont pas toujours connues

1-LPL : sn1-hydroxy, sn-2 acylphospholipide

2-LPL : sn-1-acyl, sn-2 hydroxyphospholipide

LPL : Lysophospholipide

LPS : Lysophosphatidylsérine

LPC C8 : octanoyl-lysophosphatidylcholine

LPC C8 : octanoyl-lysophosphatidylcholine

LPC C18:1: oleyl-lysophosphatidylcholine

LPC C18:2 : linoleyl-lysophosphatidylcholine

LPC CLA : conjugated linoleyl lysophosphatidylcholine

LPC DHA : docosahexaenoyl-lysophosphatidylcholine

PC : Phosphatidylcholine

PE: Phosphatidylethanolamine

PG: Phosphatidylglycerol

PI: Phosphatidylinositol

PL: Phospholipide

PS : Phosphatidylsérine

PC C8-C8: di-octanoyl-phosphatidylcholine

PC C18:1-C16:0: oleyl-palmitoyl-phosphatidylcholine

PC C18:2-C8: linoleyl-octanoyl-phosphatidylcholine

PC CLA-CLA: di-conjugated linoleyl-phosphatidylcholine

PC DHA-C8: docosahexaenoyl- octanoyl-phosphatidylcholine

PC DHA-C18:0: docosahexaenoyl-stearyl-phosphatidylcholine

PC DHA-DHA: di-docosahexaenoyl-phosphatidylcholine

Liste des illustrations

Figure 1 :A. Acide trans-9-octadécénoïque B. Acide cis-9-octadécénoïque	26
Figure 2: A. Acide linoléique (C18:2 ω 6) ; B. Acide α -linoléique (C18:3 ω 3)	27
Figure 3 : Structure et métabolisme des acides gras ω 3	28
Figure 4: Acide caprylique	28
Figure 5 : Acide docosahexaénoïque	31
Figure 6 : Voies de biosynthèse des médiateurs lipidiques résolvines et protectines à partir du DHA et de l'EPA.....	39
Figure 7 : Auto-oxydation des lipides polyinsaturés.....	42
Figure 8 : Structure de lysophospholipides	52
Figure 9 : Structure de la sphingomyéline	53
Figure 10 : Schéma d'un liposome et classification	55
Figure 11 : Devenir des triglycérides et des phospholipides lors de la digestion	57
Figure 12 : Structure d'une hydrolase, schéma du repliement α/β	61
Figure 13 : Structure de la lipase de <i>Mucor miehei</i>	62
Figure 14 : Schéma représentant les méthodes d'immobilisation enzymatique	67
Figure 15 : Sites d'actions des phospholipases	72
Figure 16 : Modification de la phosphatidylcholine par des lipases et phospholipases.....	74
Figure 17 : Mécanisme proposé pour la migration de groupement acyles.....	86
Figure 18 : Représentation graphique du domaine expérimental pour un facteur	95
Figure 19 : Représentation graphique du domaine expérimental pour 2 facteurs.....	96
Figure 20 : Représentation graphique du domaine expérimental pour 3 facteurs.....	96
Figure 21 : Représentation schématique d'un plan composite centré.....	98
Figure 22 : Gamme d'étalonnage de la PC de tournesol par la méthode au ferrothiocyanate d'ammonium	100
Figure 23 : Réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA	101
Figure 24 : Chromatogramme obtenu par HPLC couplée à un détecteur UV (205 nm) d'un échantillon d'estérification entre la GPC, le DHA et l'acide caprylique	107
Figure 26 : Réaction d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique.....	111
Figure 27 : Effet de la température d'évaporation et de nébulisation sur la hauteur des pics	119
Figure 28 : Influence du débit d'azote sur la hauteur des pics	120
Figure 29 : Influence de la température de la colonne sur le nombre de plateaux théoriques	121

Figure 30 : Chromatogramme obtenu par HPLC sur colonne Poroshell 120 couplée à un DEDL d'un mélange de standards de 10 acides gras libres.....	122
Figure 31 : Courbes de calibration pour les 10 acides gras considérés.....	123
Figure 32 : Chromatogrammes d'échantillons d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique.....	127
Figure 33 : Profil en acides gras des phosphatidylcholines de tournesol obtenu par CPG....	128
Figure 34 : Chromatogrammes d'échantillons d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA obtenu par HPLC-DEDL-UV.....	129
Figure 35 : Chromatographie sur couche mince des fractions de purification de la synthèse de PC DHA-C8.....	131
Figure 36 : Chromatogrammes UV de l'analyse HPLC sur colonne en phase HILIC (A) et en phase inverse (B) de la fraction 12 obtenue après purification de l'échantillon de la réaction d'estérification.....	132
Figure 37 : Spectre ESI-MS de la PC DHA-C8, acquisition en mode positif.....	133
Figure 38 : Spectres ESI-MS (A) et ESI-MS-MS (B) de la LPC DHA, acquisition en mode positif.....	134
Figure 39 : Chromatogrammes d'un échantillon de synthèse de PC DHA-C8 analysé par HPLC.....	135
Figure 40 : Gammes d'étalonnage de la LPC C18:1 et la PC C18:1-C16:0.....	136
Figure 41 : Gamme d'étalonnage de la PC DHA-DHA.....	137
Figure 42 : Comparaison de différents mélanges de solvants et de deux appareillages à ultrasons pour l'extraction des lipides totaux.....	139
Figure 43 : Coefficients du modèle.....	142
Figure 44 : Qualité descriptive et prédictive du modèle.....	143
Figure 45 : Courbes d'isoréponses de la quantité de phospholipides extraits en fonction des interactions entre les facteurs.....	145
Figure 46 : Profil en acides gras des lipides totaux et des trois classes de lipides de <i>Tisochrysis lutea</i>	148
Figure 47 : Réaction d'acidolyse entre de l'acide caprylique et des PC de tournesol.....	150
Figure 48 : Vitesses initiales (A) et cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique catalysée par 4 lipases commerciales.....	151
Figure 49 : Etude de la quantité d'enzyme sur la vitesse initiale (A) et les cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique.....	153

Figure 50 : Vitesses initiales (A) et cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique selon différents rapports molaires C8:0/PC	154
Figure 51 : Etude de l'effet de l'activité de l'eau de l'enzyme et de la préparation enzymatique sur la vitesse initiale (A) et les cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique	156
Figure 52 : Réaction d'acidolyse (phosphatidylcholines structurées) ou d'hydrolyse (LPC C18:2) entre acide caprylique et la phosphatidylcholine de tournesol.....	157
Figure 53 : Etude de l'effet de la température sur la vitesse initiale (A) et sur les cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique.....	158
Figure 54 : Effet de la température sur l'apparition de LPC C18:2 lors de la réaction d'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique	159
Figure 55 : Régression des coefficients avec leur intervalle de confiance du plan d'expériences basé sur la quantité de PC C18:2-C8 synthétisée en 54h	163
Figure 56 : Surface de réponse de la quantité de PC C18:2-C8 produite en 54h en fonction de la température et de l'activité de l'eau	164
Figure 57 : Cinétique enzymatique de l'acidolyse de PC de tournesol par de l'acide caprylique dans les conditions optimales obtenues par le plan d'expériences.....	164
Figure 58 : Régression des coefficients avec leur intervalle de confiance pour le plan d'expériences basé sur la vitesse initiale pour réponse	165
Figure 59 : Vitesses initiales de synthèse de PC C18:2-C8 en fonction de l'activité de l'eau et de la température	166
Figure 60 : Réaction d'acidolyse entre les phospholipides microalgaux de <i>Tisochrysis lutea</i> et l'acide caprylique	168
Figure 61 : Chromatogrammes d'échantillons d'acidolyse des phospholipides microalgaux avec de l'acide caprylique par la lipase TL-IM.....	169
Figure 62 : Réaction d'estérification par une lipase entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA	170
Figure 63 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA obtenu pour 4 lipases commerciales.....	171
Figure 64 : Cinétiques (A) et vitesses initiales (B) de la production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA obtenues pour 4 lipases commerciales.....	173

Figure 65 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et du DHA à différents rapports molaires (GPC/C8:0/DHA).....	174
Figure 66 : Cinétiques (A) et vitesses initiales (B) de la production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA à différents rapports molaires (GPC/C8:0/DHA).....	176
Figure 67 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (B) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes quantités d'enzyme	177
Figure 68 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (B) de la production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes quantités d'enzyme	178
Figure 69 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA avec et sans vide	179
Figure 70 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (B) de production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA avec et sans vide	180
Figure 71 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes températures	182
Figure 72 : Cinétiques (A) et vitesses initiales (B) de production de LPC DHA obtenu par réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes quantités d'enzyme	183

Liste des tableaux

Tableau 1 : Recommandations nutritionnelles quotidiennes de l'apport en DHA et DHA+EPA selon l'âge	40
Tableau 2 : Teneur en EPA et DHA dans les microalgues	45
Tableau 3 : Commercialisation de produits riches en AGPI fabriqués à base de microalgues	46
Tableau 4 : Industriels fabriquant des produits à partir d'huile de thraustochytrides	47
Tableau 5 : Structure chimique des glycérosphospholipides	51
Tableau 6 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par estérification à l'aide de phospholipases	76
Tableau 7 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par acidolyse à l'aide de phospholipases.....	79
Tableau 8 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par estérification à l'aide de lipases	82
Tableau 9 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par transestérification à l'aide de lipases.....	84
Tableau 10 : Réactifs et fournisseurs	92
Tableau 11 : Solvants et fournisseurs.....	93
Tableau 12 : Paramètres du plan d'expériences portant sur l'extraction des phospholipides microalgaux.....	98
Tableau 13 : Gradient d'élution pour l'analyse de la réaction d'acidolyse.....	104
Tableau 14 : Gradient d'élution pour l'analyse de la réaction d'estérification.....	106
Tableau 15 : Gradient de solvants utilisés pour la séparation des produits de synthèse	107
Tableau 16 : Gradient d'élution pour l'analyse UHPLC-MS	108
Tableau 17 : Paramètres du plan d'expériences portant sur le modèle d'étude	113
Tableau 18 : Données d'étalonnage, limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), précision et justesse	124
Tableau 19 : Tests de robustesse	126
Tableau 20 : Mélange des solvants utilisés pour l'extraction des lipides microalgaux	138
Tableau 21 : Matrice du plan d'expériences réalisé et résultats expérimentaux	140
Tableau 22 : Coefficient du modèle	141
Tableau 23 : Coefficient du sous-modèle.....	143
Tableau 24 : Matrice d'expérience des réactions d'acidolyse.....	160

Introduction

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux de recherche menés au laboratoire ces dernières années et notamment après la mise en évidence d'une forte proportion en acide docosahexaénoïque 4z, 7z, 10z, 13z, 16z, 19z (DHA) dans les phospholipides microalgaux de *Tisochrysis lutea*.

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui sont largement utilisés dans le domaine industriel. Le caractère émulsifiant de ces molécules en fait des composés utilisés dans l'industrie technique, alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. La capacité des phospholipides à former des liposomes est largement utilisée en médecine et en pharmacologie. En effet, ce sont des molécules vectrices efficaces. Elles sont composées de 2 chaînes d'acyle dont la nature peut varier, leur conférant ainsi des propriétés différentes. Ce travail propose de synthétiser, à l'aide du génie enzymatique, des phospholipides structurés ayant pour acides gras du DHA et de l'acide caprylique.

Le DHA est un acide gras polyinsaturé (AGPI) de la famille des $\omega 3$ composé de 22 carbones et de 6 doubles liaisons. Il intéresse le monde scientifique depuis les travaux de Dyeberg *et al.*, en 1978, qui ont mis en évidence la prévention des maladies cardiovasculaires chez les esquimaux par l'apport de DHA dans l'alimentation. Depuis, les travaux de recherche sur cet acide gras n'ont cessé de démontrer les effets positifs du DHA sur la santé. En effet, il permettrait de prévenir l'hypertension artérielle, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la démence sénile. Chez la femme enceinte, les risques de prééclampsie et d'accouchement prématuré sont réduits lorsque le DHA est suffisamment apporté à l'organisme ; il jouerait également un rôle dans la prévention de la dépression *post-partum*. C'est également un constituant majeur de la structure et du fonctionnement cérébral et visuel.

La production de DHA chez l'être humain est très faible et nécessite un précurseur, l'acide α -linoléinique. Il est recommandé d'en consommer 250 mg/jour. La demande en DHA sous forme de compléments alimentaires est donc croissante et de plus en plus de produits industriels sont enrichis en acides gras $\omega 3$ tel que le DHA. Cet acide gras est principalement retrouvé dans les aliments d'origine marine et tout particulièrement chez les microalgues. Le DHA est ensuite accumulé tout au long de la chaîne alimentaire marine. Il est donc intéressant d'utiliser les microalgues à des fins de production de DHA pour satisfaire les demandes croissantes en cet acide gras.

L'acide caprylique, lorsqu'il est consommé par voie orale, favorise une perte de poids du sujet par la régulation des gènes adipogéniques. De plus, il a été démontré que lors de l'apport de triglycérides composés d'AGPI et d'acide caprylique, la présence d'acide caprylique limite l'oxydation des AGPI présents sur le triglycéride.

Le DHA est mieux absorbé lorsqu'il est ingéré sous forme de phospholipide que lorsqu'il est sous sa forme libre, sous forme d'ester éthylique ou estérifié à un triglycéride. Il a également été démontré que lorsque le DHA est lié à un phospholipide, il passe mieux la barrière hémato-encéphalique, le cerveau étant un organe où les besoins en DHA sont importants.

De plus, un phospholipide structuré composé de DHA et d'acide caprylique a plusieurs intérêts. Le DHA est un AGPI fortement oxydable et cela pose problème quant à la capacité d'adressage de la molécule sous sa forme non oxydée à l'organisme. Ainsi, la production de phospholipides structurés composé de DHA et d'acide caprylique permettrait de prévenir l'oxydation de la molécule de DHA. La tête polaire du phospholipide agit également contre l'oxydation du DHA.

Dans ce travail, deux voies de synthèse enzymatiques de phospholipides structurés composés de DHA et d'acide caprylique ont été étudiées :

- La première voie de synthèse utilisée, l'acidolyse de phospholipides issus de la microalgue *Tisochrysis lutea* avec de l'acide caprylique permet la valorisation de la fraction phospholipidique de la microalgue, fraction qui est peu valorisée par le monde industriel. Les phospholipides microalgaux étant une ressource difficile à obtenir, l'acidolyse a été dans un premier temps étudiée sur des phosphatidylcholines de tournesol à l'aide d'un plan d'expériences.
- La deuxième voie de synthèse étudiée est l'estérification enzymatique de glycérophosphocholine (GPC) par du DHA et de l'acide caprylique. La réaction d'estérification a été optimisée selon la méthode d'un facteur à la fois. Cette réaction présente par ailleurs l'intérêt de produire un standard pour la réaction d'acidolyse.

L'utilisation de lipases permet de limiter les apports énergétiques liés à la réaction, mais également de cibler une position du glycérol pour la fixation des acides gras. De plus, elles permettent la réalisation de ces réactions en milieux fondus, c'est-à-dire en l'absence de solvant. Contrairement à une synthèse chimique, l'utilisation des lipases permet de diminuer les réactions secondaires et les problèmes de séparations post-réaction grâce à leur sélectivité.

L'approche méthodologique de cette étude a conduit à diviser le travail en plusieurs chapitres.

Le premier chapitre de ce travail consiste en une synthèse bibliographique qui portera sur 3 thèmes. Le premier rappelle la structure et les rôles des acides gras dans l'organisme. L'intérêt du DHA et de l'acide caprylique sur la santé est développé. Une présentation des sources d'AGPI est également réalisée. Le second thème traite de la structure des phospholipides, de leurs différentes applications ainsi que leurs intérêts physiologiques lorsqu'ils sont enrichis en DHA. Enfin, le troisième thème s'intéresse aux lipases et à leur utilisation pour l'obtention de phospholipides structurés.

Le second chapitre présente les matériels et les méthodes utilisés.

Dans le chapitre III, la présentation des résultats obtenus est subdivisée en 3 parties. La première partie décrit le développement de méthodes analytiques permettant le suivi des réactions de synthèse. La deuxième partie consiste en une optimisation de l'extraction des lipides microalgaux et de l'étude de la répartition du DHA entre les classes de lipides de la microalgue. Puis la troisième partie s'intéresse à la synthèse enzymatique de phospholipides structurés selon deux voies de synthèse : l'acidolyse et l'estérification. Le but de cette partie est d'obtenir les meilleures conditions pour la synthèse d'un phospholipide structuré composé de DHA et d'acide caprylique. La réaction d'acidolyse est tout d'abord étudiée entre les phosphatidylcholines de tournesol et l'acide caprylique. Un criblage enzymatique est réalisé puis le rapport molaire, la température, la quantité d'enzyme et l'activité de l'eau sont étudiés. La réaction est ensuite optimisée par la méthode des plans d'expériences. Les résultats du plan d'expériences sont alors appliqués à l'acidolyse entre les phospholipides microalgaux et l'acide caprylique. Puis, la synthèse par estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA est étudiée. Les paramètres étudiés sont le rapport molaire, la température, la quantité d'enzyme et l'application d'un vide permettant ainsi d'ôter l'eau du milieu réactionnel. Chaque facteur est étudié indépendamment des autres.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale afin de résumer les principaux résultats et présenter les perspectives du travail effectué.

I Etude bibliographique

1 Les acides gras

1.1 Généralités

Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique pouvant être dérivé en acides gras méthylés, hydroxylés, hydroperoxylés, etc... Ce sont des molécules composées d'une chaîne hydrocarbonée de 4 à 36 carbones, rarement au-delà de 28, terminée par un groupe carboxyle. Ils se caractérisent par la longueur de leur chaîne carbonée, par le nombre d'insaturations et par la position de ces insaturations au sein de la chaîne. Les acides gras sont classés en trois catégories, les acides gras saturés, les acides gras monoinsaturés et les acides gras polyinsaturés (AGPIs).

La présence d'une double liaison conduit à la formation de deux configurations de la molécule, la configuration *E* et la configuration *Z*. Dans le cas d'une configuration *E*, les 2 hydrogènes entourant la double liaison sont de part et d'autre de la chaîne carbonée, dans le cas d'une configuration *Z*, les 2 hydrogènes entourant la double liaison sont du même côté de la chaîne carbonée. La Figure 1 illustre ces configurations sur l'exemple d'un acide gras à 18 carbones. La configuration *Z* est la plus fréquente. La configuration *E* est retrouvée à l'état naturel dans les produits laitiers, les graisses et la viande de ruminants. Ils sont sinon obtenus lors du traitement d'hydrogénation des huiles végétales dans l'industrie agro-alimentaire.

La nomenclature biochimique s'intéresse uniquement au nombre de carbones et au nombre de doubles liaisons et se présente sous la forme $C_x:y \omega z$ ou $C_x:y n-z$ où x représente le nombre de carbones, y le nombre d'insaturations et z , la position de la première insaturation par rapport à l'extrémité méthylée. Ainsi, le DHA composé de 22 carbones, 6 insaturations et dont la première insaturation se trouve à 3 carbones de l'extrémité méthylée sera noté $C_{22:6} \omega 3$ ou $C_{22:6} n-3$. Pour la suite de ce travail, la notation $C_x:y \omega z$ sera employée.

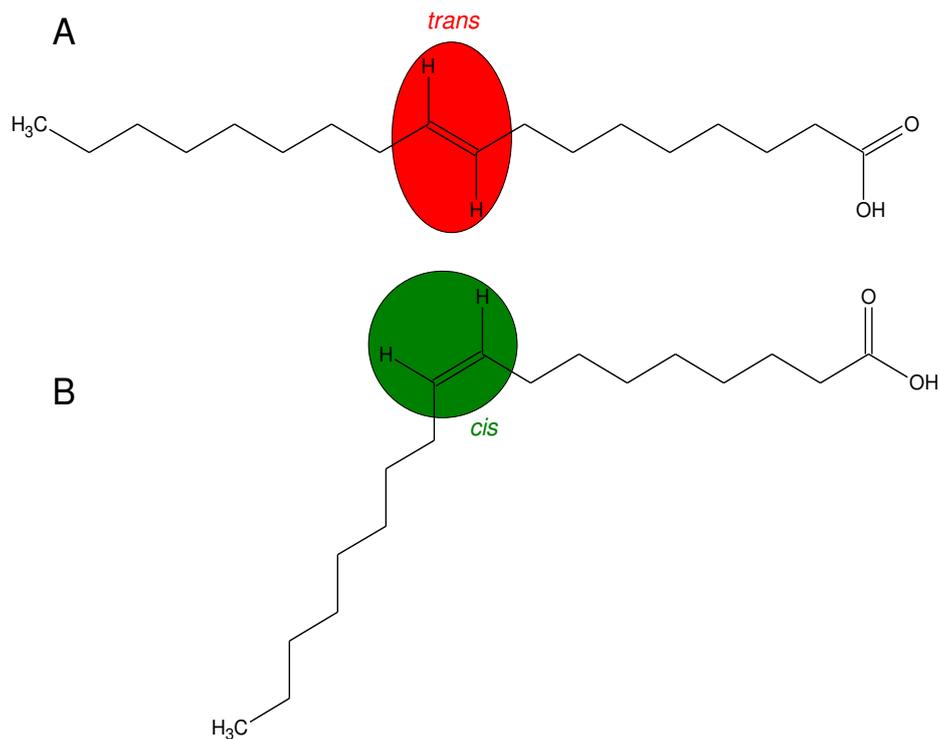


Figure 1 :A. Acide trans-9-octadécénoïque B. Acide cis-9-octadécénoïque

1.1.1 Les acides gras essentiels et indispensables

Un acide gras indispensable correspond à un acide gras qui ne peut pas être synthétisé par l'organisme. Chez l'homme, deux acides gras sont indispensables, l'acide linoléique (C18:2 ω6) et l'acide α-linolénique (C18:3 ω3) (Figure 2). Ces deux acides gras doivent donc être apportés par l'alimentation. Ils sont indispensables car ce sont les précurseurs des deux familles d'acides gras ω3 et ω6. Les acides gras ayant pour précurseur l'acide linoléique (C18:2 ω6) et l'acide α-linolénique (C18:3 ω3) sont des acides gras dit essentiels. Un acide gras essentiel est un acide gras qui joue un rôle vital pour l'organisme, mais qui peut être synthétisé par celui-ci.

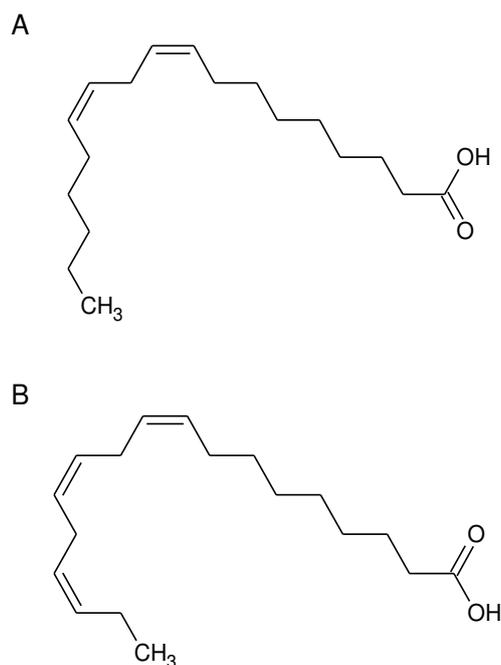


Figure 2: A. Acide linoléique (C18:2 ω6) ; B. Acide α-linolénique (C18:3 ω3)

1.1.1.1 [Les acides gras ω6](#)

Le précurseur de cette famille, l'acide linoléique C18:2 ω6, est l'acide gras le plus petit de la famille des ω6 [1]. Les acides gras ω6 sont des acides gras polyinsaturés présents dans la plupart des huiles végétales, graines et céréales. Ils sont retrouvés dans les œufs ou certaines viandes en quantités variables selon l'alimentation des animaux [2]. Ces acides gras sont essentiels excepté le précurseur, qui lui, est indispensable.

1.1.1.2 [Les acides gras ω3](#)

Le précurseur de cette famille est l'acide α-linolénique (ALA), noté C18:3 ω3. L'ALA est désaturé par une Δ-6 désaturase pour donner de l'acide stéaridonique (C18:4 ω). Son élongation via une élongase suivie d'une désaturation (via la Δ-5 désaturase) conduit à l'acide eicosapentaénoïque (EPA C20:5 ω3). Trois autres réactions, élongation, désaturation (par la Δ-6 désaturase) et β-oxydation, conduisent de l'EPA au DHA (C22:6 ω3) (

Figure 3) [3]. Chez l'homme, les rendements de synthèse de ces deux molécules sont faibles. Il est donc conseillé d'apporter ces deux acides gras par l'alimentation. Ils sont trouvés notamment dans les organismes marins. En effet, seul le phytoplancton a la capacité de synthétiser ces deux acides gras sans précurseur.

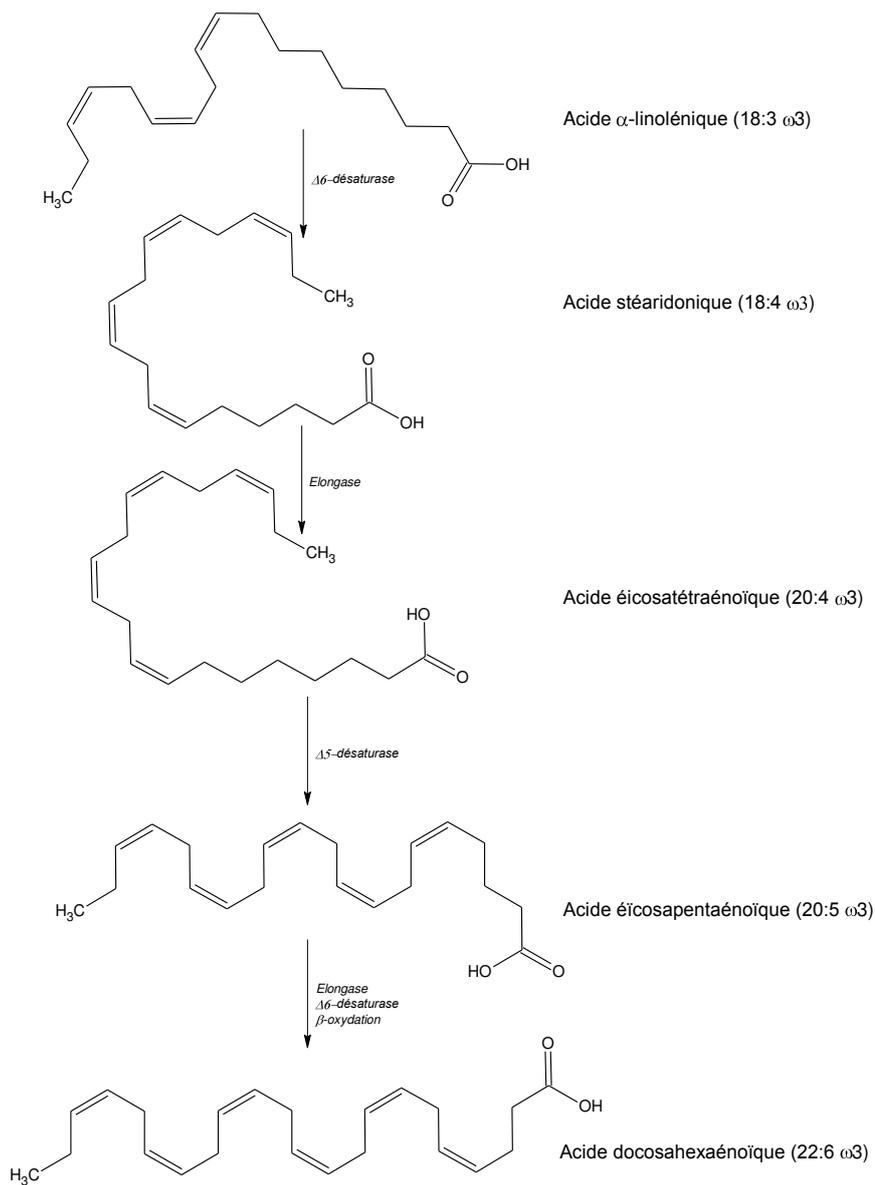


Figure 3 : Structure et métabolisme des acides gras ω 3 [4]

1.1.2 L'acide caprylique

L'acide caprylique ou acide octanoïque (C8:0) est un acide gras saturé comportant 8 carbones

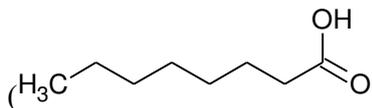


Figure 4).

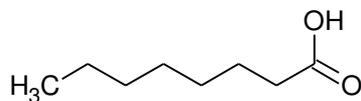


Figure 4: Acide caprylique

Les acides gras à chaînes moyennes (AGCM), dont l'acide caprylique fait partie, sont connus pour favoriser la perte de poids chez l'homme lorsqu'un régime riche en AGCM est suivi [5]. En effet, ils permettent la régulation des gènes adipogéniques. De plus, des effets bénéfiques sur la sécrétion de glucose ainsi que sur le métabolisme des lipides ont été observés [6]. Il a été démontré que les AGCM sous forme de triglycérides apportés par voie orale entraînent une réduction de l'oxydation des AGPI [7]. L'hypothèse avancée est que les AGCM dans le foie sont préférentiellement impliqués dans la voie de la β -oxydation tandis que les AGPIs tels que l'ALA sont stockés dans les cellules où ils peuvent être convertis en DHA [8].

Au niveau de la digestion, l'acide caprylique sous forme de triglycéride peut être directement absorbé par la muqueuse stomacale, il n'y a donc pas nécessité d'action de la bile ni de sucs pancréatiques pour l'émulsification de ces triglycérides [9].

L'acide caprylique joue également un rôle dans l'acylation des protéines. L'acylation d'une protéine correspond à la formation co- ou post-traductionnelle d'une liaison covalente entre un acide gras activé en acyl-CoA et un résidu d'acide aminé de la protéine substrat. La formation d'une liaison ester entre un acide caprylique et la chaîne latérale d'une sérine se nomme l'octanoylation (O-acylation). L'acylation concerne de très nombreuses protéines (enzymes, récepteurs, oncogènes, suppresseurs de tumeur, protéines impliquées dans la transduction des signaux, protéines de structure eucaryotes et même virales). Elle exerce une grande variété de fonctions dans les régulations cellulaires puisque la liaison covalente d'un acide gras à une protéine change son hydrophobicité et permet de réguler l'ancrage de la protéine à la membrane. Elle a aussi pour rôle de modifier son adressage subcellulaire ou encore d'induire des interactions entre sous-unités protéiques. La découverte progressive de nombreuses protéines dont la fonction est régulée par l'acylation, donne donc un nouvel intérêt fonctionnel à cet acide gras saturé [10].

1.2 Rôle des acides gras dans l'organisme

1.2.1 Source d'énergie

Les acides gras apportés par l'alimentation principalement sous forme de triglycérides sont une source majeure de combustible pour le métabolisme cellulaire. Après leur absorption au niveau intestinal par les entérocytes, ces acides gras sont véhiculés dans la circulation sanguine sous la forme de lipoprotéines approvisionnant les tissus utilisateurs (tissu adipeux, muscle, foie). Ils

sont stockés sous forme de triglycérides regroupés dans les adipocytes sous forme de gouttelettes lipidiques [11].

Par leur catabolisme, notamment par la β -oxydation mitochondriale, tous les acides gras alimentaires fournissent de l'énergie (1 g de lipides équivaut à 9 kilocalories, contre 4 kilocalories pour les glucides et les protéines). Lors d'un effort de longue durée, l'organisme consomme prioritairement le glycogène et puise en parallèle dans ses stocks lipidiques. Il dégrade alors les acides gras afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

1.2.2 Rôle structural

Les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides : les phospholipides et les glycolipides qui ont un rôle dans la formation des membranes. La composition en acides gras de ces lipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité, viscosité).

Les acides linoléique (C18:2 ω 6), arachidonique (C20:4 ω 6) et docosahexaénoïque (C22:6 ω 3) sont des constituants fondamentaux des phospholipides membranaires. Ils modulent au sein des membranes cellulaires les propriétés physiques des membranes en influent sur la fluidité, la dynamique et la perméabilité membranaire. Ils modifient également les propriétés chimiques des membranes en influençant leurs compositions et leurs implications dans les voies de signalisation : en effet, l'activité d'un grand nombre d'enzymes, de transporteurs, de récepteurs et de canaux ioniques impliqués dans la signalisation inter- et intracellulaire. Cet effet peut être direct, par la constitution d'un microenvironnement peu ordonné et flexible, facilitant les changements de conformation nécessaires à l'activité de protéines intrinsèques ou indirect ; ils peuvent également induire la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés enrichis en acides gras saturés, glycosphingolipides et en cholestérol (les radeaux lipidiques) auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (impliqués par exemple dans la signalisation transmembranaire) [12].

1.3 L'acide docosahexaénoïque

Chez l'homme, le DHA (C22:6 ω 3) (Figure 5), s'il n'est pas apporté par l'alimentation, est biosynthétisé par la conversion de l'acide α -linoléique en acide eicosapentaénoïque (EPA) (C20:5 ω 3) qui sera modifié par la suite pour obtenir du DHA.

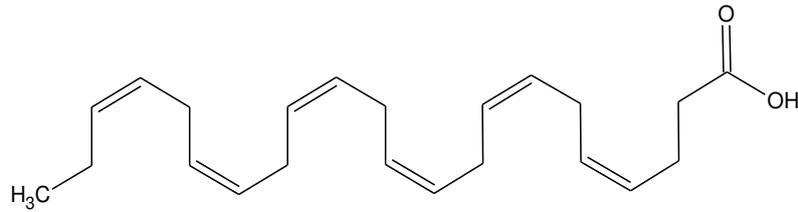


Figure 5 : Acide docosahexaénoïque

La voie de synthèse du DHA à partir de l'acide α -linoléinique est faiblement active pour de multiples raisons biochimiques, physiologiques, physiopathologiques et nutritionnelles. Par exemple, les désaturases nécessaires à la synthèse de DHA sont également impliquées dans la désaturation des acides gras $\omega 6$. Il y a donc concurrence entre la voie de synthèse des $\omega 6$ et des $\omega 3$ pour les désaturases, enzymes nécessaires à l'insertion de doubles liaisons sur la chaîne carbonée. Le taux de conversion de l'acide α -linoléinique en EPA est très limité, de l'ordre de 5 à 8%, et moins de 0,5% de l'acide α -linoléinique est converti en DHA [13] ce qui justifie en termes nutritionnels de s'en procurer directement dans l'alimentation en plus de l'apport du précurseur α -linoléinique.

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne, particulièrement l'EPA et le DHA, sont présents sur les membranes cellulaires des vertébrés. Ces AGPI représentent 21 à 36% des acides gras totaux dans les membranes cellulaires, mais la proportion d'EPA et de DHA varie énormément suivant les tissus. Chez les mammifères notamment, le DHA est trouvé en forte concentration dans les cellules photoréceptrices de la rétine (50%) [14], les testicules (8 à 24%) [15] et le cortex cérébral (15%) [16].

1.4 DHA et santé

Depuis plus de quarante ans, l'attention s'est portée sur l'intérêt des acides gras $\omega 3$ suite aux premiers travaux de Dyerberg *et al.* [17] sur la faible prévalence des maladies cardiovasculaires chez les Esquimaux. Cette particularité est rapidement attribuée aux effets spécifiques de leur alimentation riche en acides gras $\omega 3$ provenant des poissons gras et des mammifères marins. Depuis, les AGPI et plus spécialement le DHA sont largement étudiés pour comprendre et expliquer différentes pathologies.

Il est recommandé que le rapport massique $\omega 6/\omega 3$ tende vers 5 dans les apports alimentaires pour éviter que les acides gras $\omega 6$ n'induisent une compétition excessive vis-à-vis des acides

gras $\omega 3$. Actuellement, il est reconnu que dans les populations occidentales le rapport $\omega 6/\omega 3$ n'est pas adéquat, il est de l'ordre de 10-20 :1 selon les individus considérés [18]. La prévalence d'acides gras $\omega 6$ par rapport aux acides gras $\omega 3$ conduit à l'émergence de physiopathologies telles que des maladies cardiovasculaires, mais aussi la résistance à l'insuline (diabète de type 2), des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires, des maladies du système nerveux central, de la rétine, ou encore favorise la cancérogénèse.

1.4.1 Développement

Lors du développement foetal, l'accumulation du DHA se fait essentiellement au cours du dernier trimestre de la grossesse, mais cette accumulation se poursuit en période postnatale et pendant les deux premières années de vie. Le DHA s'accumule de façon préférentielle dans les membranes des cellules photoréceptrices de la rétine et des neurones où il joue un rôle essentiel [19].

L'apport de DHA du foetus se fait par le passage transplacentaire. Le statut en AGPI du nouveau-né est donc corrélé avec le statut maternel mais est supérieur chez le nouveau-né montrant ainsi qu'il existe un ou plusieurs mécanismes conduisant à une accumulation préférentielle de certains acides gras pendant la vie foetale [20].

L'organisation ainsi que la structuration des réseaux neuronaux se déroulent pendant les trois derniers mois de la vie foetale et jusqu'à l'âge de deux ans. C'est aussi durant cette période que l'incorporation et l'accumulation du DHA dans les structures du système nerveux sont les plus actives. L'acide arachidonique et le DHA sont deux molécules indispensables à la croissance et au développement du système nerveux. En effet, ils auront une action sur le développement des prolongements neuronaux, l'établissement et la stabilisation des synapses et la myélinisation. Des apports réguliers de ces deux acides gras, à la femme enceinte et dans la petite enfance, permettent d'assurer correctement le développement des capacités motrices, sensorielles et cognitives [21].

La couverture des besoins en AGPI pendant les premiers mois de vie est assurée par le lait maternel. Cependant, sa composition en AGPI est d'une grande variabilité car dépendante de l'alimentation de la mère. Dans une étude comparant une alimentation par du lait infantile non supplémenté en DHA et du lait maternel, il a été montré que les nourrissons alimentés au lait infantile présentent une diminution significative du contenu en DHA des lipides plasmatiques

ou des phospholipides des membranes des globules rouges mais également une plus faible concentration en DHA cérébral par rapport aux enfants allaités [19].

Une méta-analyse récente montre une meilleure maturation visuelle appréhendée par les méthodes comportementales à deux mois de vie, chez les enfants nés à terme ayant reçu un lait artificiel supplémenté en DHA par rapport aux enfants ayant reçu un lait non supplémenté [22].

Chez l'enfant prématuré, les effets bénéfiques sur le développement neurosensoriel d'une supplémentation en DHA dans les formules de lait artificiel sont admis depuis plusieurs années [23].

Des études ont montré une relation entre la croissance fœtale et la consommation maternelle en acides gras $\omega 3$. D'après différents marqueurs biochimiques (AGPI $\omega 3$ et $\omega 6$, prostaglandines) quantifiés dans l'épithélium des vaisseaux ombilicaux, les enfants de petits poids de naissance seraient déficitaires en $\omega 3$ [24].

Dans une étude menée par Mulder, les enfants dont les mères n'ont pas reçu de supplémentation en DHA au cours de leur grossesse présentent un retard dans le développement du langage tant au niveau de la compréhension que de la formulation de phrases [25].

1.4.2 Risques associés à la grossesse

La grossesse place la femme dans des conditions physiologiques particulières. Au cours de ces neuf mois, une pathologie peut se développer et porter préjudice soit à l'enfant, soit à la mère soit aux deux. Parmi ces pathologies, l'hypertension artérielle au cours de la grossesse est la plus connue et peut mener à des risques d'accouchement prématuré et des risques de prééclampsie.

Dans le cadre d'une étude chez les femmes inuits dont l'alimentation est riche en acides gras $\omega 3$ d'origine marine, il a été constaté qu'elles présentaient 2,6 fois moins de risques de développer une hypertension artérielle que pour les femmes ne bénéficiant pas de tels apports [24].

Un accouchement avant terme peut s'accompagner de complications pour le nouveau-né. Ces complications peuvent conduire à la mort du nourrisson. Bon nombre d'enfants prématurés ayant passé des semaines critiques suivant leur naissance souffrent d'une incapacité à vie,

notamment en matière d'apprentissage et de troubles visuels et auditifs. Une étude d'Olsen (2004) [26] suggère que le risque d'accouchements avant terme est quatre fois moins important chez les femmes ayant un régime riche en $\omega 3$. De plus, le DHA permettrait la réduction des concentrations en thromboxane pro-inflammatoire et augmenterait les niveaux en prostaglandine PGE2 ce qui améliore la perfusion utéroplacentaire et donc l'apport en oxygène au fœtus [27].

Le DHA permettrait également la prévention de la dépression *post-partum* qui touche environ 7% des mères dans les trois mois suivant l'accouchement. En effet, après l'accouchement, les réserves maternelles en DHA se renouvellent lentement et souvent incomplètement, ce qui est corrélé selon certaines études à la dépression *post-partum*. Pendant cette période, le taux de DHA plasmatique est inférieur chez les femmes qui présentent une dépression *post-partum* [1].

1.4.3 Fonction visuelle

Le DHA est retrouvé en forte concentration dans la rétine à hauteur de 30% des acides gras totaux [28]. Il est indispensable à la fonction rétinienne et joue un rôle structural, fonctionnel et protecteur qui est primordial dans la phototransduction. En effet, les propriétés biochimiques et biophysiques du DHA peuvent affecter les fonctions des membranes en altérant leur perméabilité, leur fluidité et leur épaisseur.

De par sa structure, le DHA influence la dynamique de communication inter- et intra-cellulaire. Les membranes riches en DHA sont moins rigides et moins denses que celles riches en acides gras $\omega 6$ permettant alors une communication inter- et intra-cellulaire plus rapide [29].

De plus, le DHA permettrait de prévenir l'inflammation et la mort cellulaire par le biais des métabolites actifs de l'oeil, tel que la neuroprotectine. Ce même métabolite joue un rôle protecteur contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge [30].

1.4.4 Pathologies et acides gras $\omega 3$

1.4.4.1 Système cardiovasculaire

Une consommation régulière de DHA et d'EPA permet la prévention de la formation d'un athérome qui se caractérise par l'accumulation de lipides sur l'endothélium. Une plaque d'athérome qui se décroche peut conduire à un infarctus du myocarde ou à l'accident vasculaire

cérébral. La plaque d'athérome se développe suite à une inflammation régulière de l'endothélium, cette inflammation est due à différents paramètres qui sont la dyslipidémie, l'hyperglycémie et l'hypertension. Les acides gras $\omega 3$ ont des effets spécifiques sur deux de ces facteurs de risques à savoir la dyslipidémie et l'hypertension artérielle [31].

La dyslipidémie est une anomalie qualitative ou quantitative d'un ou plusieurs lipides plasmatiques. Deux classes de lipides, le cholestérol et les triglycérides, sont principalement incriminées lors de dyslipidémie. Une étude de Affane *et al.* (2016) sur des rats obèses dont l'alimentation est enrichie en huile de sardine démontre l'efficacité des AGPI à longue chaîne sur la teneur sérique en cholestérol HDL (High Density Lipoprotein) (fraction anti-athérogène) en l'augmentant [32]. Une amélioration de la dyslipidémie et une réduction du risque cardiovasculaire sont observées.

Une autre étude, menée chez le rat également, portant essentiellement sur l'hypertension, démontre que le DHA sous forme de monoglycérides permet de diminuer la pression sanguine. Chez les sujets souffrant d'hypertension, la première adaptation physiologique est un épaississement de la paroi du ventricule gauche. Toujours dans le cadre d'un régime enrichi en DHA sous forme de monoglycérides, il est observé une diminution de la paroi du ventricule gauche et également une diminution des marqueurs pro-inflammatoires [33].

1.4.4.2 [Système nerveux central](#)

Le DHA est un acide gras largement représenté dans le tissu cérébral. Il permet notamment le développement optimal du système nerveux central.

Le DHA joue un rôle structural en agissant sur la plasticité membranaire comme cela a été observé pour la rétine. L'effet structural peut impliquer la modulation de la synthèse de phospholipides membranaires régulant certains éléments des voies de signalisation comme les protéines kinases C et l'apoptose (phosphatidylsérine). La PS est connue pour son implication dans la régulation des protéines clés de plusieurs voies de signalisation comme les protéines kinases C. Sur un modèle de cellules neuronales en culture (Neuro 2A), l'étude de Akbar *et al.*, met en évidence la voie d'action du DHA sur la régulation d'un facteur pro-apoptotique, la caspase-3 [34,35].

Le DHA a également un rôle fonctionnel. En effet, sous l'action de la phospholipase A2 (PLA2), il peut être libéré pour être métabolisé par les cyclooxygénases ou lipoxygénases en

médiateurs lipidiques oxygénés appelés eicosanoïdes. Ces eicosanoïdes présentent des effets immunomodulateur et anti-inflammatoire, en s'opposant aux effets produits par les eicosanoïdes synthétisés à partir de l'acide arachidonique [36]. Le DHA aurait également un rôle neuroprotecteur comme précurseur de dérivés endoperoxydés tel que la neuroprostane [37].

Par son rôle prépondérant au sein du tissu cérébral, le DHA permet la prévention de pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la démence sénile.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative due au dépôt d'une plaque amyloïde qui interagit avec la microglie et provoque une inflammation modérée localisée autour des neurones. Dans les premiers stades de la maladie, cette inflammation modérée participe à la dégradation neuronale, principalement due au dysfonctionnement des cellules gliales. Ce dysfonctionnement conduit à l'absence de clairance des plaques amyloïdes, ce qui augmente encore la sur-activation des cellules gliales. Dans l'ensemble, un environnement nuisible est créé, retirant le soutien des cellules gliales aux neurones et favorisant la formation de plaques amyloïdes. Le DHA joue un rôle au niveau des cellules gliales en limitant la libération par celles-ci de signaux pro-inflammatoires et favorise la libération d'un antioxydant par ces mêmes cellules [38]. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques, animales et cliniques ont montré qu'une consommation importante de DHA est associée à une diminution du risque de développer une maladie neurodégénérative [39].

Le DHA améliore aussi le quotidien de personnes atteintes de troubles psychiques. Dans le cas de la dépression, une étude de cohorte sur des femmes et des hommes français d'âge moyen a démontré qu'un apport de 0,1% de l'apport énergétique sous forme d'AGPI est associé avec un risque réduit d'épisodes dépressifs, notamment pour les hommes non-fumeurs [40].

Dans le cas de dépression sévère, un rapport $\omega 6/\omega 3$ élevé est associé avec un risque accru de suicide. Le trouble anxieux ainsi que la dépression sévère sont associés à un taux de corticolibérine élevé [41]. Il est admis que ces deux troubles psychiques sont associés à des comportements violents de la part des individus qui en souffrent. La sécrétion de corticolibérine dépend de la présence de prostaglandine PGE2 dans le tissu cérébral. Cette libération de PGE2 est favorisée par un régime riche en acides gras $\omega 6$ tel que l'acide arachidonique. En enrichissant le régime d'individus souffrant de dépression sévère en acides gras $\omega 3$, une diminution du taux d'acides gras $\omega 6$ dans le tissu cérébral et donc une diminution de PGE2 est observée se traduisant par une diminution de corticolibérine [42].

1.4.4.3 [Cancer](#)

En France, plus de 80 000 personnes meurent chaque année du cancer, c'est la première cause de mortalité et donc pose un problème majeur de santé publique. Les facteurs liés au mode de vie et à l'environnement ont un important impact dans le processus de carcinogenèse. L'institut national du cancer estime à 40% les cancers liés à des facteurs externes tels que l'environnement (rayonnement, virus, produits industriels...) ou le mode de vie (tabac, alcool, alimentation...) et que seulement 5-10% des cancers sont liés à la transmission d'une mutation héréditaire connue. D'après l'étude de Tomasetti *et al.* (2015) [43], le reste des cancers serait le fruit du hasard. Cependant, cette étude est très controversée et l'étude d'Albini *et al.* (2015) [44] explique ce chiffre par les faibles connaissances du cancer plutôt que par un phénomène de hasard.

Dans ce cadre, la qualité des aliments ainsi que leur nature peut limiter le risque de développer un cancer au cours de sa vie. Ainsi, les effets d'une alimentation riche en DHA ont été étudiés à l'aide d'études de cohorte. Elles suggèrent que les régimes riches en acides gras de la famille des $\omega 3$ d'origine marine réduiraient le risque de développement tumoral dans différents types de cancers à savoir, le cancer colorectal, de la prostate et du sein [45].

Le développement des cellules tumorales suit plusieurs étapes : la survie de la première cellule cancéreuse, la prolifération, l'invasion [46], l'angiogenèse [47] et le développement de métastases. Le DHA semble jouer un rôle clef dans plusieurs de ces étapes [48].

Il a été démontré que le DHA inhibe le potentiel invasif des cellules cancéreuses sur différents modèles cellulaires tels que les cellules cancéreuses du sein, des reins, de la peau et des poumons [48].

Des études ont également mis en évidence l'implication des AGPIs dans le processus d'angiogenèse tumorale. Il a été démontré que les acides gras $\omega 6$ stimulent les processus angiogéniques majeurs dans les cellules endothéliales humaines et que les acides gras $\omega 3$ les inhibent. L'angiopoïétine est une protéine qui entre en jeu dans l'invasion endothéliale et la formation des vaisseaux. Or la PGE2, dérivée des acides gras $\omega 6$, augmente sa production par des facteurs de croissance tandis que la prostaglandine E3 (PGE3), dérivée des acides gras $\omega 3$, l'inhibe [47].

De plus, une étude menée sur un modèle murin a mis en évidence qu'une consommation de DHA par des sujets atteints de cancer permettrait de réduire le risque de développement de métastases [49].

Pour finir, lors du traitement par chimiothérapie de patients atteints de cancer, une alimentation riche en DHA permettrait d'augmenter la sensibilité des tumeurs au traitement comme il l'a été observé sur la lignée cellulaire MDA-MB-231. En présence de DHA et d'un antioxydant, la lignée cellulaire est plus sensible à la doxorubicine, un cytotoxique utilisé en chimiothérapie [50].

1.4.4.4 [Diabète](#)

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie due à une insulino-résistance et à un dysfonctionnement des cellules β des îlots de Langerhans impliquées dans la production de l'insuline. En France, la prévalence globale du diabète était estimée à 4,6% de la population en 2011 et le diabète de type 2 correspond à 90% des cas. La prévalence de la maladie est par ailleurs en augmentation continue depuis plusieurs années, avec une hausse de 5,4% par an entre 2000 et 2011.

La nature des acides gras de l'alimentation est susceptible de moduler le risque de survenue d'une insulino-résistance et à long terme d'un diabète de type 2. Chez le rat, il apparaît que les acides gras polyinsaturés $\omega 3$ à longue chaîne sont susceptibles de prévenir l'insulino-résistance périphérique et d'améliorer la sensibilité à l'insuline dans le diabète de type 2 [51].

1.4.4.5 [Maladies inflammatoires](#)

De nombreuses pathologies sont liées à une inflammation chronique des tissus. Ainsi, il est reconnu aujourd'hui, que de nombreuses maladies débutent par une inflammation des tissus comme c'est le cas pour l'athérosclérose, le diabète de type 2 et le syndrome du côlon irritable. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il sera retrouvé également une inflammation du tissu cérébral qui, elle, sera la conséquence de la maladie.

Les médiateurs lipidiques tels que les PGE2 et les leucotriènes, synthétisés à partir de l'acide arachidonique, ont un rôle clé dans l'initiation d'une inflammation aiguë en recrutant les polynucléaires neutrophiles sur le foyer de l'inflammation. Ils ont donc un rôle pro-inflammatoire. A l'inverse, les résolvines et les protectines, synthétisées à partir de l'EPA et du DHA permettent un retour à la normale de cette inflammation en limitant le recrutement des

polynucléaires neutrophiles. Le terme résolvine, proposé par Serhan *et al.*, englobe des molécules di- et trihydroxylées. Deux types de résolvines peuvent être rencontrés, les résolvines D synthétisées à partir du DHA et les résolvines E synthétisées à partir de l'EPA (Figure 6) [52],45].

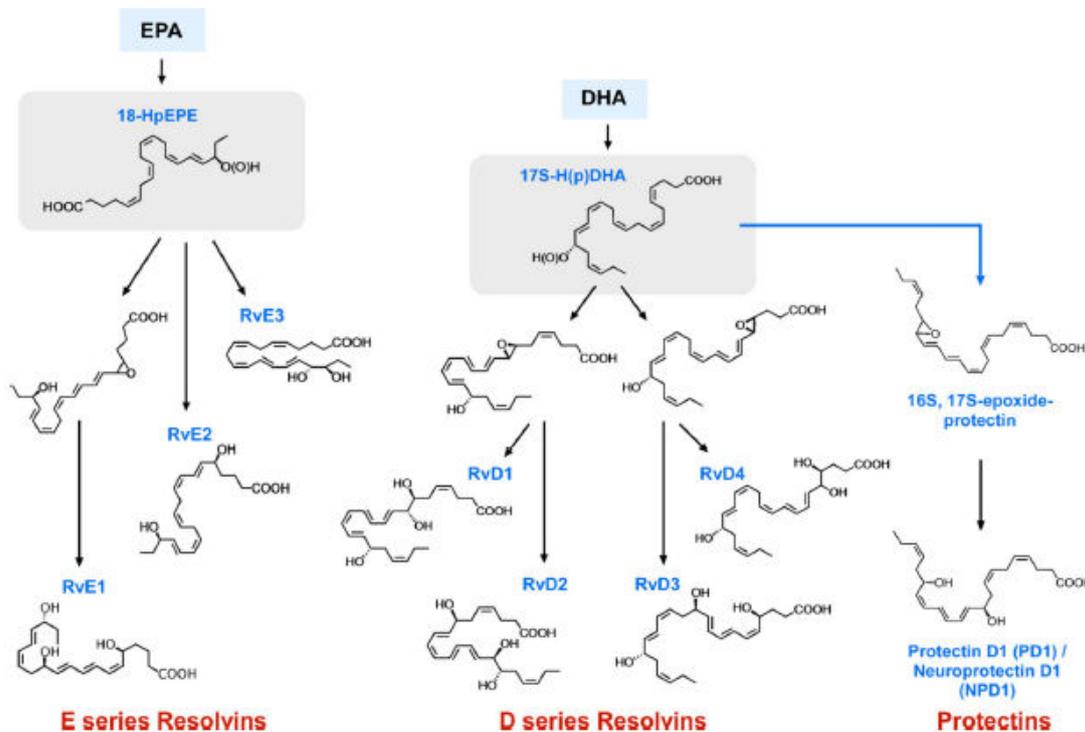


Figure 6 : Voies de biosynthèse des médiateurs lipidiques résolvines et protectines à partir du DHA et de l'EPA [54]

Sous l'action de l'interleukine 1 libérée par les cellules endothéliales activées, la PLA2 catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en position sn-2 pour libérer les acides gras. Différents acides gras vont être libérés selon la composition des phospholipides membranaires. La libération de DHA dans le cytoplasme inhibe l'action de la cyclooxygénase COX₂ qui est nécessaire à la synthèse de PGE₂ à partir d'acide arachidonique. Ce mécanisme d'action est d'ailleurs celui de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'aspirine [55].

1.5 Apports nutritionnels conseillés

Par définition, les besoins nutritionnels concernent l'individu tandis que les apports nutritionnels conseillés se réfèrent à une population, dans les deux cas en bonne santé. Le besoin nutritionnel est la quantité de nutriments nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme. Les apports nutritionnels conseillés sont définis en France par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) en fonction des besoins

nutritionnels moyens pour une population moyenne à laquelle est ajoutée une marge de sécurité de 2 écarts types.

Le DHA est un constituant majeur de la structure et du fonctionnement cérébral et visuel. Le faible taux de conversion de l'acide α -linoléique en DHA a conduit à fixer le besoin physiologique minimal à 250 mg.j⁻¹ pour un adulte. Cette valeur est deux fois plus élevée que celle précédemment proposée en 2001. Le Tableau 1 indique les recommandations nutritionnelles quotidiennes en fonction de l'âge et de l'état physiologique du sujet [56].

Tableau 1 : Recommandations nutritionnelles quotidiennes de l'apport en DHA et DHA+EPA selon l'âge (ANSES, 2011)

Age	DHA (mg)	EPA + DHA (mg)
Nouveau-né (0-6 mois)	0,32% des AG totaux	-
Nourrisson (6-12 mois)	70	-
1-3 ans	70	-
3-9 ans	125	250
10 ans et plus	250	500

La forme sous laquelle le DHA est apporté modifie largement sa biodisponibilité pour l'organisme. Ce point est traité dans le paragraphe 2.5.

1.6 Oxydation des acides gras ω 3

1.6.1 Mécanismes d'oxydation

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'oxydation lipidique. Il peut s'agir de facteurs intrinsèques tels que le nombre et la position des insaturations ainsi que la présence de molécules pro-oxydantes dans le milieu (métaux, enzymes). Il peut également s'agir de facteurs extrinsèques comme la température, la lumière, la pression partielle en oxygène et l'activité de l'eau. La structure chimique des lipides joue également un rôle dans l'oxydabilité des AGPIs. En effet, comme le démontrent Song *et al.* [57] sur le DHA, l'oxydabilité est plus importante

quand le DHA est lié à des triglycérides que lorsqu'il est sous forme d'esters éthyliques ou lié à un phospholipide.

L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents activateurs que sont l'auto-oxydation, la photo-oxydation et l'oxydation enzymatique catalysée par la lipoxigénase et la cyclooxygénase.

La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines ou la riboflavine.

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique qui est due à l'enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 7). L'auto-oxydation correspond à une fixation d'oxygène sur des molécules insaturées qui peut être liée soit à une scission radicalaire due à des températures élevées, soit à la présence d'ions métalliques ou de radicaux libres déjà présents.

L'initiation consiste en la production d'un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras. La propagation consiste en la production de plusieurs radicaux libres. Lorsque ceux-ci se combinent pour former des composés non radicalaires, c'est la dernière étape de l'auto-oxydation, à savoir, la terminaison.

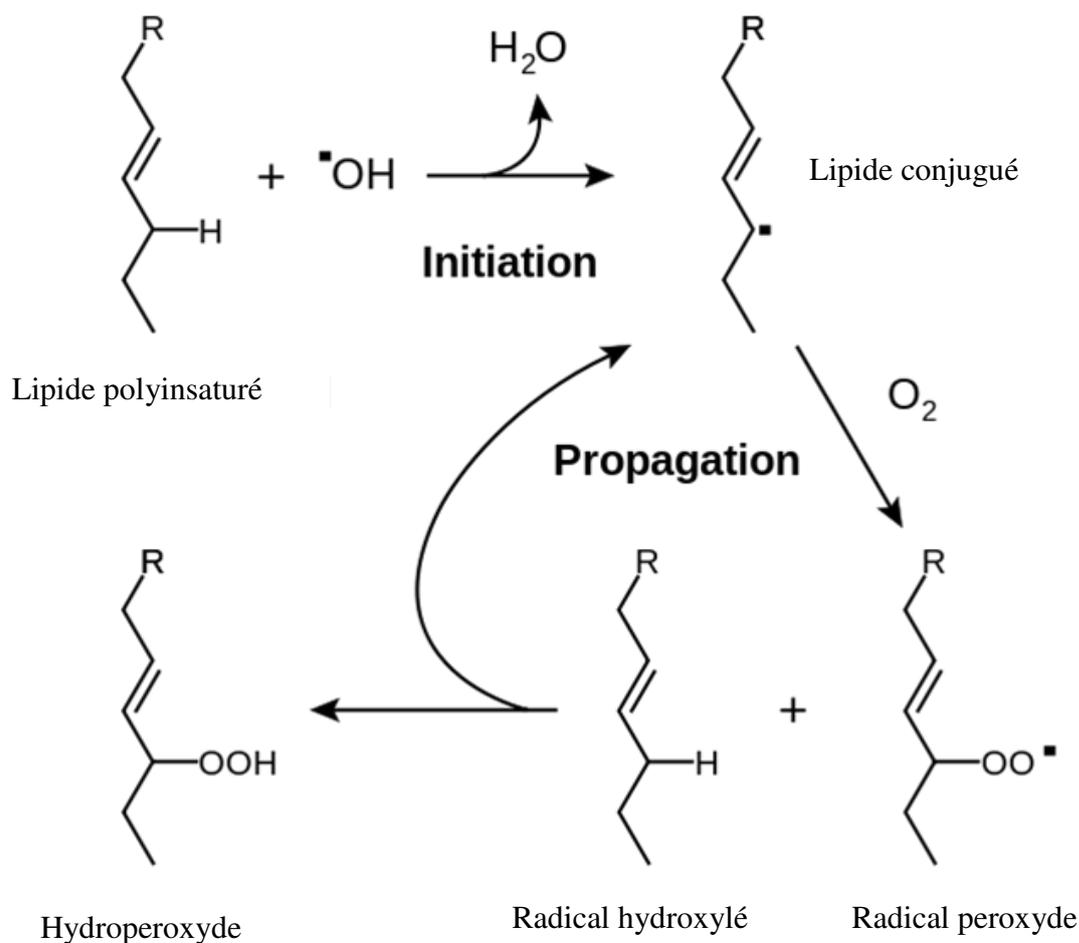


Figure 7 : Auto-oxydation des lipides polyinsaturés [58]

1.6.2 Les antioxydants

Les antioxydants peuvent être retrouvés soit sous forme de protéines à activité enzymatique et non enzymatique (séquestration de métaux), soit sous forme de petites molécules liposolubles ou hydrosolubles. B. Halliwell [59] définit un antioxydant comme étant une substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat.

Les antioxydants capables de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être répartis en deux grands types, les antioxydants préventifs et les antioxydants chaîne rompue. Ces deux types d'antioxydants sont utilisés mais diffèrent par leur mode d'action.

Les antioxydants préventifs empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou interceptent les espèces responsables de l'initiation. Dans les antioxydants préventifs, il sera

retrouvé des chélateurs de métaux tels que l'acide ascorbique ou encore l'EDTA. Il sera également retrouvé des désactivateurs de l'oxygène singulet comme le β -carotène. D'autres mécanismes d'action consistent en l'élimination des hydroperoxydes par des enzymes telle que la glutathion peroxydase. Le dernier mécanisme d'action retrouvé pour les antioxydants préventifs est le piégeage de l'oxygène comme c'est le cas pour l'acide ascorbique et les sulfites [60].

Les antioxydants « chain breaking » vont avoir un rôle au niveau de la propagation. En effet, ils interceptent les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique et ainsi, la retardent. Tout comme pour les antioxydants préventifs, il est retrouvé différents mécanismes d'actions. Certains antioxydants « chain breaking » vont avoir pour rôle de céder un hydrogène, c'est le cas notamment des composés phénoliques tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT), les flavonoïdes et le sésamol [61]. D'autres sortes d'antioxydants vont former avec les radicaux libres des produits non radicalaires et ainsi stopper la propagation.

1.7 Les sources d'AGPI

1.7.1 Les huiles de poisson

Actuellement pour l'homme, la source primaire d'AGPI ω 3 est le poisson et les huiles de poissons. Les huiles de poissons sont récupérées à partir des co-produits marins tels que les viscères ainsi que les chairs restants sur les arêtes après filetage. Les propriétés organoleptiques des huiles de poissons en font un produit peu attractif pour le consommateur. Les huiles et les graisses de poissons proviennent principalement d'espèces comme le hareng, la sardine, l'anchois, la morue et le capelan. 70% de ces huiles vont être transformées en margarine, les 30% restants sont utilisés en aquaculture, dans des produits cosmétiques, nutraceutiques et pharmaceutiques [62].

Comme l'homme, les poissons marins n'ont pas la capacité de synthétiser ces AGPI ω 3 en grande quantité et donc la teneur élevée de leurs lipides riches en AGPI ω 3 est due à leur régime alimentaire. L'environnement aquatique est riche en micro-organismes synthétisant en grande quantité les AGPI ω 3 tels que le DHA et l'EPA. Les poissons incorporent les AGPI ω 3 dans leurs tissus par le biais de la chaîne alimentaire à partir du plancton et les prédateurs à partir des poissons mangeant du plancton. Chez les poissons gras comme le saumon, l'EPA et le DHA

représentent respectivement 8,3% et 16,1% des acides gras. Ces acides gras sont principalement portés par des triglycérides [63].

Cependant, le poisson comme source d'AGPI ω 3 présente des désavantages. En effet, les poissons prédateurs, en fin de chaîne alimentaire, sont contaminés par des métaux lourds comme le mercure et le cuivre. Ils sont également contaminés par des polluants organiques tels que les polychlorobiphényles et les dioxines connus pour avoir un effet délétère sur la santé [64]. De plus, la pêche intensive cause la raréfaction des poissons et mène à un épuisement des ressources marines. La FAO (Food and Agriculture Organization) estime à 77% la proportion d'espèces de poissons impactées par la surpêche à différents degrés. Concernant les stocks mondiaux, 7% seraient épuisés, 17% surexploités, 52% exploités à leur maximum, 3% sous-exploités, 1% en cours de reconstitution et 20% modérément exploités.

1.7.2 Les crustacés

Le krill qui représente une famille de micro-crustacés pélagiques voisins de la crevette est un des premiers éléments du réseau trophique marin avec les copépodes. Il se nourrit également de phytoplancton. Dans l'huile de krill, le DHA représente 6,77% des acides gras totaux et l'EPA représente 11,14%. Il est à noter que ces AGPI ω 3 sont portés principalement par les phospholipides dans les huiles de krill [63].

1.7.3 Les organismes unicellulaires

1.7.3.1 Les microalgues

Les microalgues marines sont des producteurs primaires d'AGPI. Ce sont des organismes eucaryotes unicellulaires, et selon leur espèce, elles varient de quelques micromètres (μ m) à quelques centaines de μ m.

Les microalgues marines forment une ressource bien perçue par le consommateur comme produit naturel d'origine végétale et constituent donc une bonne alternative aux huiles de poissons. De plus, il est possible de les produire en grande quantité à l'aide de photobioréacteurs permettant le contrôle des différents paramètres de culture [65].

Les microalgues d'eau douce produisent en grande quantité l'acide α -linoléique mais pas l'EPA, ni le DHA à l'exception de *Monodus subterraneus* qui synthétise de l'EPA en grande quantité [66].

Les pourcentages en acides gras peuvent être variables en fonction des conditions de culture. La microalgue *Tisochrysis lutea* présente 29% d'AGPI totaux lorsqu'elle est cultivée de manière mixotrophe contre 26,1% lorsqu'elle est cultivée de manière phototrophe. Cependant, la teneur en DHA est de l'ordre de 10% contre 8,6% lorsqu'elle est cultivée de manière phototrophe. Les teneurs en EPA sont faibles dans les deux conditions de culture (1,5%) [67]. Hu *et al.* ont étudiés la croissance de *T.lutea* en présence de différentes sources de carbones (glycérol, glucose et acétate). Il a été constaté qu'en mixotrophie, cette microalgue utilisait uniquement le glycérol comme source de carbone. Dans un deuxième temps, cette même étude montre que la mixotrophie a légèrement augmentée la teneur en acide docosahexaénoïque (DHA) et en acides gras totaux dans le poids sec après 16 jours de culture. Au contraire, l'hétérotrophie a réduit la teneur en DHA et la production d'acides gras totaux [68]

Tableau 2 : Teneur en EPA et DHA dans les microalgues (% des acides gras totaux) [65]

Microalgues	EPA	DHA	Microalgues	EPA	DHA
<i>Isochrysis galbana</i>	-	15	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	13,5	9,9
<i>Cricosphaera</i> sp.	28	-	<i>Fragilidium</i> sp.	20,9	26,3
<i>Nitzschia</i> sp.	17	-	<i>Gymnodinium kowalevskii</i>	0,1	9,5
<i>Chroomonas</i> sp.	12,9	7,1	<i>Gymnodinium</i> sp.	12,6	22
<i>Amphidinium carterae</i>	20	24	<i>Gymnodinium sanguineum</i>	14,1	24,2
<i>Ceratium furca</i>	7	21	<i>Prorocentrum spp</i>	15-32	3-5
<i>Cochlodinium spp</i>	11	28	<i>Prorocentrum mexicanum</i>	1,1	18,3
<i>Gonyaulax spp</i>	12-34	1-16	<i>Prorocentrum micans</i>	1,5	22
<i>Peridinium triquetum</i>	19	2	<i>Scrippsiella</i> sp.	1,8	18,8
<i>Amphidinium carterae</i>	4	2	<i>Pavlova lutheri</i>	12	7
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	25,3	1,4	<i>Amphidinium</i> sp.	-	17
<i>Odontella aurita</i>	23,4	13,5	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	-	44

La majorité des microalgues marines contiennent de l'EPA et du DHA, cependant, le rapport EPA/DHA est très variable d'une microalgue à l'autre (Tableau 2). Ainsi, il est possible de trouver des souches ne synthétisant que de l'EPA telles que *Cricosphaera sp.* ou *Nitzschia sp.* et des souches synthétisant principalement du DHA telles que *Isochrysis galbana*, *Cryptocodinium cohnii* ou *Amphidinium sp.* Ce rapport varie également selon les conditions de cultures. L'âge de la culture, la température et la composition du milieu de culture sont des paramètres pouvant influencer la proportion d'EPA et/ou de DHA synthétisés [69].

A l'heure actuelle, plusieurs entreprises valorisent déjà ces deux acides gras $\omega 3$ issus de différentes microalgues (Tableau 3). En 2011, le marché mondial des AGPI $\omega 3$ (principalement EPA et DHA) était de 5,3 milliards d'euros. Le marché européen de l'EPA et du DHA en 2008 était en croissance de 13% par an [70].

Tableau 3 : Commercialisation de produits riches en AGPI fabriqués à base de microalgues [71]

Fabricant	Microalgue
Ocean's alive (USA)	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
Martek/DSM (USA/NL)	<i>Cryptocodinium cohnii</i>
Blue Biotech (Allemagne)	<i>Nannochloropsis sp</i>
InnovalG (France)	<i>Odontella aurita</i>

1.7.3.2 [Les bactéries](#)

Les bactéries marines sont également des producteurs primaires d'AGPI $\omega 3$ dans les chaînes marines ainsi que dans les communautés commensales des animaux. Il a longtemps été considéré que les bactéries ne synthétisaient pas d'AGPI $\omega 3$, cependant les recherches de Nichols *et al.* [72] ont montré que certaines bactéries marines, notamment les bactéries extrémophiles, étaient capables de synthétiser en grande quantité du DHA et de l'EPA [73]. Cependant, la culture de ces bactéries, nécessitant des fortes pressions et de faibles températures, en fait une source d'AGPI $\omega 3$ exigeante tant d'un aspect technique que financier.

Les bactéries commensales des flores intestinales de poissons pélagiques ont été étudiées. Certaines de ces bactéries ont la capacité de synthétiser ces AGPI $\omega 3$, elles permettent d'assurer au poisson la fourniture en DHA dont celui-ci peut manquer en l'absence de phytoplancton. Ce sont principalement les bactéries du genre *Vibrio* qui, isolées de l'intestin, en l'absence de DHA, sont capables de synthétiser du DHA à hauteur de 6,4 à 11,6% des acides gras totaux synthétisés [65].

1.7.3.3 Les thraustochytrides

Les thraustochytrides (*Thraustochytrium* et *Schizochytrium*), microorganismes marins unicellulaires straménophiles (cellule biflagellée avec 2 flagelles différents : un flagelle lisse et un flagelle plumeux), sont une source émergente pour la production de DHA. Cela est notamment dû à leur taux de croissance élevé en bioréacteur ainsi que leur forte teneur en lipides. Cependant, ces microorganismes nécessitent l'apport de carbone organique dans le milieu de culture contrairement aux microalgues qui sont autotrophes. De plus, comme pour les microalgues, la quantité d'AGPI ω 3 synthétisée et notamment de DHA dépend des paramètres de cultures comme l'ont démontré Shene *et al.* [74].

Des produits issus de ces thraustochytrides sont déjà exploités comme le montre le Tableau 4. Comme pour les microalgues, le rapport EPA/DHA peut varier d'une souche à l'autre, mais également d'une condition de culture à l'autre. Ainsi, une souche de *Schizochytrium* produit le DHA comme unique AGPI ω 3. Pour une autre souche, près de 80% des acides gras totaux sont représentés par des AGPI ω 3 [65].

Tableau 4 : Industriels fabriquant des produits à partir d'huile de thraustochytrides [71]

Fabricant	Protiste
Flora health (USA)	<i>Schizochytrium</i>
Xiamen Huison Biotech Co (Chine)	<i>Schizochytrium</i>
Lonza 2010 (Suisse)	<i>Ulkenia</i>

1.7.4 Localisation de l'EPA et du DHA dans les classes de lipides

Les lipides peuvent être répartis en 3 grandes classes :

- les lipides neutres formés de triglycérides, d'acides gras libres et de stérols
- les glycolipides constitués chez les végétaux essentiellement de monogalactosyldiglycérides, de digalactosyldiglycérides et de sulfoquinovosyldiglycérides
- les phospholipides composés de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylglycérol.

Au sein de ces 3 grandes classes sont retrouvées des lipides simples et des lipides complexes. Les lipides simples sont composés uniquement d'atomes de carbones, d'oxygène et d'hydrogène. Les lipides complexes sont quant à eux composés des trois atomes précédemment cités ainsi que d'un ou plusieurs hétéroatomes.

Les triglycérides, qui sont des lipides simples, servent essentiellement au stockage des lipides tandis que les lipides polaires représentés par les glycolipides ainsi que les phospholipides ont quant à eux un rôle structural. En effet, les phospholipides sont les composés principaux des membranes plasmiques tandis que les glycolipides sont, chez les végétaux, des composants des membranes des thylakoïdes [69].

Les lipides polaires marins se caractérisent par leur richesse exceptionnelle en AGPI [75]. Chez les microalgues, tel qu'abordé plus tôt, les proportions en EPA et en DHA sont variables. Cependant, dans certaines microalgues, les AGPI $\omega 3$ peuvent être plus ou moins représentés dans les différentes classes de lipides. C'est le cas pour la microalgue *Isochrysis galbana* où 75% du DHA total est porté par les phospholipides. En parallèle, chez cette microalgue, très peu d'EPA est retrouvé, et ce, dans toutes les classes de lipides [76]. Nalder *et al.* [77], ont étudié le profil en acides gras des classes de lipides de *Tysochrysis lutea* à différentes phases de croissance. Il ressort de cette étude que le DHA est l'AGPI $\omega 3$ à longue chaîne le plus représenté et notamment dans les phospholipides où il est retrouvé à hauteur de 79% du DHA total en début de phase stationnaire. Pour la microalgue *Pavlova lutheri*, le DHA est également majoritairement retrouvé dans les phospholipides avec 61 à 82% du DHA total, la variation étant due aux conditions de culture [78]. Cependant, il est important de préciser que les phospholipides ne représentent que 10% des lipides totaux, la classe de lipides la plus représentée chez les microalgues étant les triglycérides.

Chez le krill, les phospholipides représentent 20,4 à 32,7% des lipides totaux. Le DHA (~29%) et l'EPA (~19%) représentent environ 48% des acides gras totaux des phospholipides de krill [79]. Cependant, la quantité d'AGPI contenue dans le krill peut varier de 28 à 54% selon la nature du plancton dont il se nourrit. Sa variabilité est d'origine biologique et dépend des années ainsi que des lieux de pêches [63].

Le profil en acides gras des phospholipides de 3 bactéries marines piézophiles a été étudié par Fang *et al.* [80]. L'espèce *Moritella japonica*, isolée d'une carotte de sédiment de la fosse du Japon (6356 m), présente 6,4% de DHA dans sa fraction phospholipidique et ne possède pas

d'EPA. Par contre, les autres espèces étudiées : *Shewanella benthica* isolée de la fosse Rkukyu (5110 m), *Shewanella violacea* isolée de la fosse des Mariannes (10 898 m) présentent respectivement des proportions d'EPA de 8,1% et 27,4% et ne possèdent pas de DHA dans la fraction phospholipidique.

Dans les huiles de poissons, il est principalement retrouvé des triglycérides. Ces huiles sont concentrées en acides gras ω 3 par méthode de winterisation. Cette méthode s'appuie sur les propriétés physiques des acides gras saturés qui, à basse température, cristallisent tandis que les AGPI ω 3 restent à l'état liquide. Des méthodes enzymatiques sont également utilisées pour obtenir des triglycérides riches en EPA et DHA. Ainsi, une huile de poisson non modifiée obtenue à partir de foie de morue contient en moyenne 8% d'EPA et 9% de DHA. Pour une huile obtenue à partir de saumon, 20 à 30% de DHA et d'EPA seront retrouvés tandis que les huiles de thon présentent une teneur en DHA de 25% et une teneur en EPA de 5%. Les huiles obtenues à partir de poissons bleus présentent une teneur en EPA de 18% et une teneur en DHA de 12%. Les huiles concentrées présentent des teneurs environ doubles en EPA et DHA. Une huile de thon concentrée présentera 50% de DHA et certaines huiles peuvent atteindre des concentrations en DHA et EPA de l'ordre de 90% [81].

2 Les phospholipides

Dans le paragraphe précédent, les bienfaits du DHA pour l'organisme ont été étudiés ainsi que les différentes sources où il peut être retrouvé. Pour certaines espèces de krill ou de microalgues, le DHA est principalement retrouvé dans la fraction phospholipidique. Ce paragraphe porte sur les phospholipides et s'oriente notamment sur les phospholipides ayant pour acide gras du DHA.

2.1 Structure

Les phospholipides appartiennent aux lipides complexes car ils comportent un atome de phosphore. Ils sont composés d'une tête polaire, comportant l'atome de phosphore, et d'une ou deux chaînes aliphatiques. Il existe plusieurs types de phospholipides, les glycérophospholipides, les phosphosphingolipides et les saccharolipides contenant du phosphore. La différenciation entre ces classes se fait par la nature du squelette de base qui peut-être soit de glycérol, soit de la sphingosine. Ce sont des molécules amphiphiles.

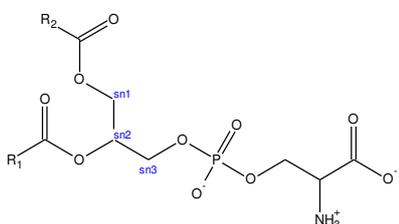
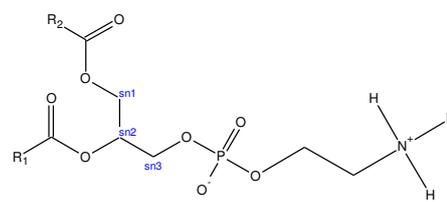
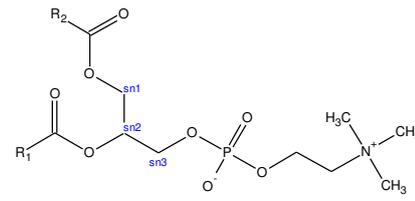
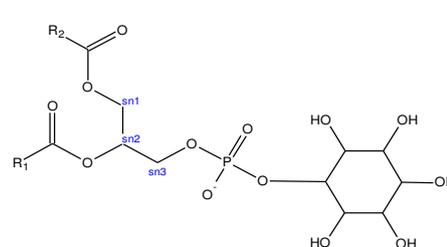
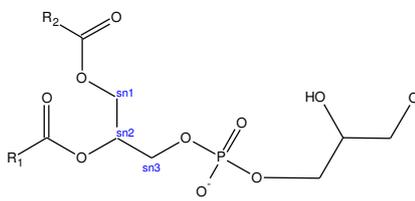
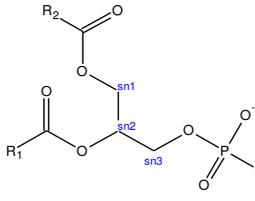
2.1.1 Les glycérophospholipides

Il existe une grande variété structurale de glycérophospholipides. Ce sont des molécules amphiphiles composées d'un squelette glycérol et d'un groupement phosphate en position sn-3 formant la partie polaire de la molécule, sn correspondant à la numérotation stéréospécifique internationale du glycérol.

Sur les deux fonctions alcools non occupées par le groupement phosphate s'estérifient un ou deux acides gras. Les acyles amènent un caractère apolaire à la molécule. La structure moléculaire ainsi que le nom des différents glycérophospholipides sont présentés dans le Tableau 5.

Le groupement phosphate peut être estérifié par un alcool aminé ou un polyol sans azote. Parmi les alcools aminés sont retrouvés, la sérine, l'éthanolamine et la choline. Dans les polyols sont retrouvés le glycérol et l'inositol. Les glycérophospholipides sont classés en fonction de cet alcool. En l'absence de la tête polaire qui peut être un groupement azoté, un sucre ou un autre glycérol, il est obtenu un acide phosphatidique. Les glycérophospholipides sont les principaux constituants des membranes. Ils sont donc fortement représentés dans le monde du vivant.

Tableau 5 : Structure chimique des glycérosphospholipides. R_1 et R_2 correspondent à des chaînes d'acide gras. sn correspond à la numérotation stéréospécifique internationale du glycérol.

Nom de l'alcool	Glycérosphospholipides	Structure
Sérine	Glycérosphosphatidylsérine	
Ethanolamine	Glycérosphosphatidyléthanolamine	
Choline	Glycérosphosphatidylcholine	
Inositol	Glycérosphosphatidylinositol	
Glycérol	Glycérosphosphatidylglycérol	
Absence d'alcool	Acide phosphatidique	

Lorsqu'une seule des deux fonctions est estérifiée en position sn-1 ou sn-2, un mono-acylglycérophospholipide ou lysophospholipide est obtenu. Les sn-1-hydroxy, sn-2 acylphospholipides (1-LPL) portent leur acyle en position sn-2 tandis que les sn-1-acyl, sn-2 hydroxyphospholipides (2-LPL) ont leur chaîne acyle estérifiée en position sn-1 (Figure 8). Comme pour les glycérophospholipides, le groupement phosphate peut être estérifié par un alcool aminé ou un polyol sans azote. La nature de la tête polaire permet de différencier les différents lysophospholipides. Lorsque le groupement phosphate n'est pas estérifié, un acide lysophosphatidique est obtenu.

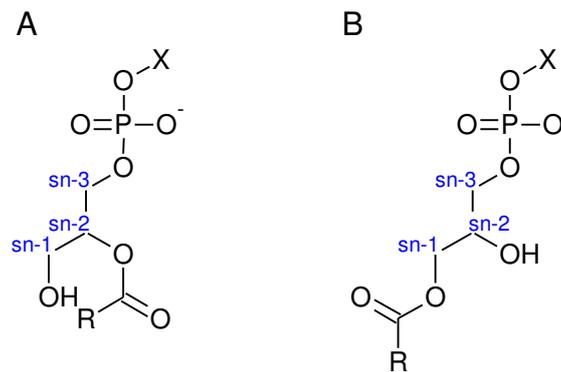


Figure 8 : Structure de lysophospholipides A) 1-LPL B) 2-LPL (X : tête polaire)

2.1.2 Les phosphosphingolipides

Les phosphosphingolipides ont pour structure de base un squelette sphingosine qui est un alcool aminé à longue chaîne insaturée. Cette sphingosine est reliée à un acide gras par une liaison amide, l'ensemble forme un groupement nommé céramide. La sphingosine porte, dans le cas des phosphosphingolipides, un groupement phosphate.

La sphingomyéline (Figure 9) est l'un des phosphosphingolipides les plus répandus, elle est constituée d'un céramide et d'un groupement phosphorylcholine. Chez l'homme, la sphingomyéline, principalement retrouvée au niveau de la gaine des axones myélinisés, est le sphingolipide le plus représenté [82].

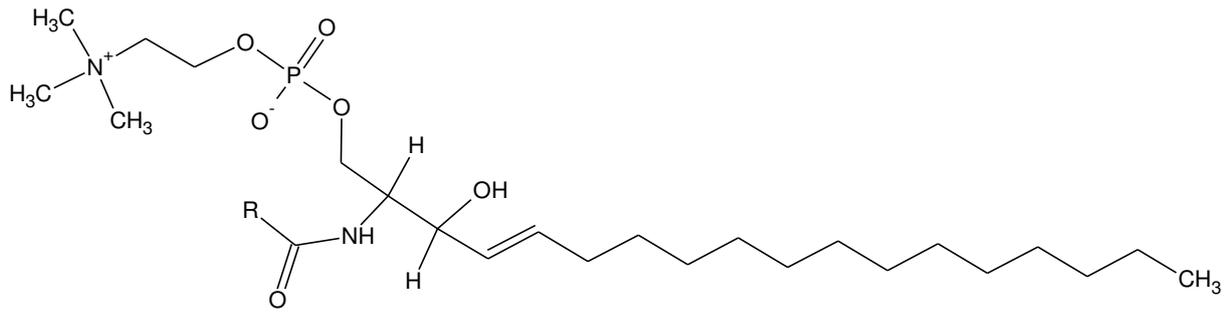


Figure 9 : Structure de la sphingomyéline

2.2 Composés essentiels des membranes

Les phospholipides ont la capacité de s'assembler en bicouche fluide, structure retrouvée dans les membranes cellulaires. Cet assemblage de phospholipides est essentiel au maintien des différents rôles de la membrane plasmique. En effet, ils permettent la circonscription du volume cytoplasmique contenant les organites. Ils assurent les échanges passifs ou actifs des molécules entre le cytoplasme et l'environnement cellulaire. De plus, les phospholipides jouent un rôle dans la transduction de signaux entre l'environnement cellulaire et le cytoplasme.

La nature des acides gras composant la membrane impacte fortement la fluidité de la membrane. En effet, les AGPI occupent un volume plus important que les acides gras saturés, rendant la membrane moins compacte en diminuant les interactions de type Van der Waals et augmentant ainsi sa fluidité. Ainsi, une modification des rapports entre les acides gras dans les membranes peut se répercuter sur leurs propriétés physicochimiques et donc sur le fonctionnement des cellules. D'ailleurs, les différentes classes de phospholipides membranaires des cellules de mammifères sont réparties de sorte à ce que les phosphatidylcholines soient majoritairement représentées sur le feuillet externe. Sur le feuillet interne des membranes, ce sont principalement des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylsérines et des phosphatidylinositol [83].

Des phospholipides composés d'une chaîne insaturée en sn-2 et d'une chaîne saturée en position sn-1 occupent un espace bien plus important au sein de la membrane qu'un phospholipide dont les deux chaînes sont saturées [84]. Ainsi, l'encombrement stérique des lipides polyinsaturés augmente mais l'épaisseur de la bicouche reste constante. La différence obtenue est compensée au niveau de la distance hydrophobe qui diminue avec l'augmentation des insaturations des chaînes, expliquant ainsi l'augmentation de la fluidité de la membrane [85].

Les lysophospholipides (LPL) quant à eux sont les messagers secondaires de nombreuses réponses biologiques telles que la réponse immune, l'agrégation plaquettaire, la prolifération et la différenciation cellulaire [86].

2.3 Applications

Les phospholipides sont largement utilisés dans le domaine industriel soit agro-alimentaire, soit pharmaceutique, nutraceutique ou encore cosmétique. Dans le domaine industriel, les phospholipides sont nommés des lécithines. Ce sont des molécules utilisées principalement pour leur caractère amphiphile.

En conséquence du caractère amphiphile, les phospholipides sont des molécules actives en surface. Les deux chaînes acyles sont attirées par les graisses et la tête polaire est attirée par l'eau. En raison de cette double nature, les phospholipides ont tendance à se positionner entre deux phases non miscibles, tels que l'huile et l'eau permettant ainsi une modification de surface à l'interface. Les produits incorporant des phospholipides sous différentes formes sont utilisés pour le mouillage, la solubilisation, la lubrification, l'émulsification ou la dispersion dans l'industrie technique, l'alimentation animale, les produits alimentaires, les produits cosmétiques et pharmaceutiques. Dans l'industrie, ils servent à la fabrication de revêtements (peintures, revêtements magnétiques, cires et polis), le traitement du verre et de la céramique et les pâtes à papier. Ils sont également utilisés dans l'industrie pétrolière, la transformation des métaux, les pesticides, les adhésifs, les textiles, et les cuirs [87]. La lécithine entre dans la composition d'une large gamme d'aliments, tels que la margarine comme émulsifiant et dans les chocolats pour contrôler la viscosité et la cristallisation [88].

Certains des aspects les plus exploités des phospholipides sont leurs propriétés émulsifiantes et leur capacité à s'auto-assembler formant des structures liposomales à des fins alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Les liposomes sont des structures fermées, constituées d'une ou plusieurs bicouches, de diamètres compris entre quelques nanomètres et plusieurs dizaines de micromètres. De nombreuses sortes de liposomes existent, ils sont classés selon leur taille et leur nombre de bicouches (Figure 10).

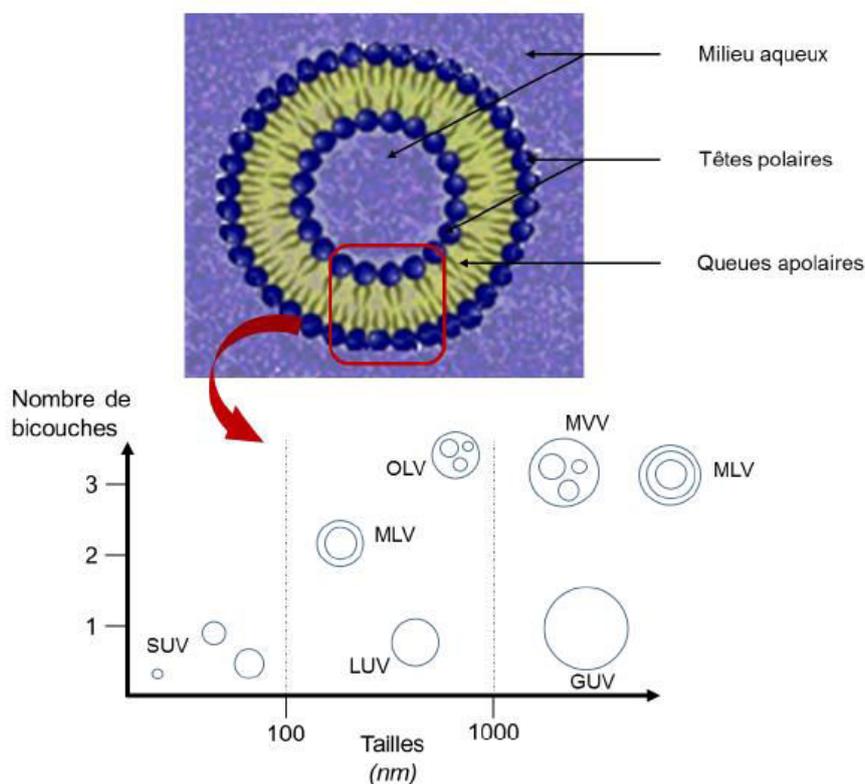


Figure 10 : Schéma d'un liposome et classification SUV : Vésicule unilamellaire de petite taille ; LUV : Vésicule unilamellaire large ; GUV : Vésicule unilamellaire géante ; MLV : Vésicule multilamellaire ; OLV : Vésicule oligolamellaire ; MVV : Vésicule multivésiculaire [89]

En médecine et pharmacologie, ces structures sont de très bons vecteurs et peuvent délivrer à la fois des médicaments hydrophiles et hydrophobes tels que des anticancéreux, des antibiotiques, des antifongiques, des immunomodulateurs, des vaccins, des enzymes ou encore des éléments génétiques. L'apport de médicaments sous cette forme présente deux principaux intérêts, la biocompatibilité et la biodégradabilité [90]. En effet, il n'y a pas de risque de rejet de la molécule vecteur, de plus, celle-ci est dégradée par le métabolisme. Les liposomes permettent un apport diffus et durable d'une molécule active tout en réduisant sa concentration locale comme c'est le cas par exemple pour l'administration de morphine qui est un composé amphiphile [91].

En agro-alimentaire, ces liposomes sont principalement utilisés dans le but de conserver le produit ou bien de fabriquer des compléments alimentaires en y incorporant des molécules actives telles que des vitamines, des antioxydants, des enzymes ou encore des extraits de plantes. L'encapsulation d'enzyme sert par exemple à accélérer la maturation de fromage [92]. Ghorbanzade *et al.* ont nano-encapsulé à l'aide de liposomes de l'huile de poisson dans le but de les ajouter à un yaourt. Dans cette étude, il a été démontré que le liposome permet de limiter

l'oxydation des huiles de poissons mais aussi de réduire les propriétés organoleptiques indésirables de ces huiles [93].

En cosmétique, les liposomes servent comme système vésiculaire afin de pénétrer l'épiderme. Ils ont pour rôle d'apporter de l'eau à la peau permettant ainsi d'améliorer l'élasticité de la peau et sa fonction de barrière dans le but de lutter contre son vieillissement [94]. Ils sont également utilisés en tant que molécules vecteur et augmentent la pénétration cutanée d'une molécule, prolongeant la durée d'action de l'actif encapsulé.

2.4 Phospholipides et digestion

En moyenne, il est consommé 2 à 8 g de phospholipides par jour. Contrairement aux triglycérides dont la digestion commence dans l'estomac, celle des phospholipides débute dans l'intestin grêle grâce à l'action de la PLA2 pancréatique. Les PLA2 hydrolysent les chaînes d'acide gras en position sn-2 des phospholipides pour donner des lysophospholipides.

Les lipides sont dispersés sous forme de gouttelettes (émulsion) dans le système digestif. Cette organisation permet la création d'une interface lipide/eau nécessaire à l'action des lipases. Les phospholipides sont conservés au niveau de l'estomac car ils aident à la bonne digestibilité des triglycérides. En effet, dans l'estomac, les lipides sont hydrolysés partiellement (10%-30% d'entre- eux) en diacylglycérols et acides gras libres grâce aux lipases gastriques afin de les rendre assimilables par la barrière intestinale; la présence de phospholipides dans le bol alimentaire joue un rôle sur le degré d'émulsification de ces triglycérides [95]. La Figure 11 montre le devenir des phospholipides dans le tube digestif.

Ils jouent également un rôle dans l'absorption des produits issus de la lipolyse. Les triglycérides ayant atteint sous forme native la lumière de l'intestin grêle sont hydrolysés par la lipase pancréatique qui hydrolyse les triglycérides aux positions sn-1 et sn-3. Des monoacylglycérols et des acides gras libres sont alors obtenus. Un clivage complet des triglycérides en glycérol et acides gras libres n'arrive que rarement [96]. Sous l'influence des sels biliaires et des phospholipides, les acides gras libres et les monoacylglycérols sont absorbés sous forme de micelles mixtes par diffusion passive. Cependant, un transport actif est également assuré par des protéines de transport des acides gras qui sont situés dans la membrane des entérocytes. A titre d'exemple, la FATP4 qui est exprimée dans la membrane des entérocytes joue un rôle essentiel dans le transport des AGPIs à longue chaîne. En effet, la réduction de l'expression de cette protéine mène à une absorption deux fois moins efficace de ces acides gras [97].

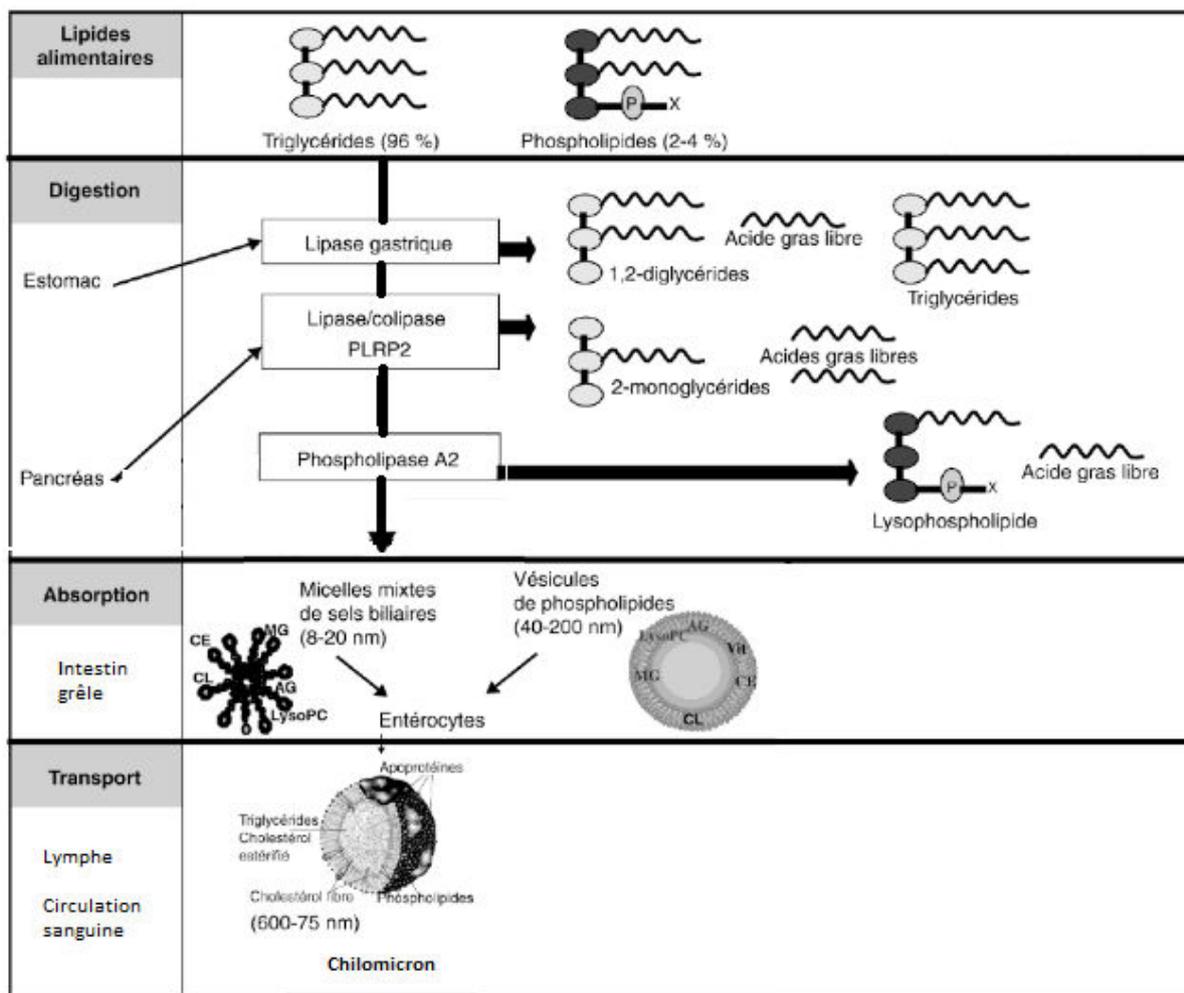


Figure 11 : Devenir des triglycérides et des phospholipides lors de la digestion (PRLP2: lipase pancréatique apparentée 2; CE: Cholestérol estérifié; MG: Monoacylglycérol; AG: Acide gras libre; LysoPC: lysophosphatidylcholine; CL: Cholestérol libre; Vit: vitamine liposoluble) [95]

2.5 Biodisponibilité du DHA

Dans le cadre de l'alimentation, deux variables sont à prendre en compte : la quantité de nutriments apportés mais également la forme sous laquelle ils sont apportés. Ces deux variables définissent la biodisponibilité. Ainsi, la biodisponibilité est la quantité de nutriment pouvant être absorbé et transporté dans la circulation systémique. Cette quantité peut être, principalement en raison de la métabolisation et de l'excrétion, plus faible que la quantité initialement absorbée.

Des études montrent l'influence de la forme chimique de présentation des acides gras, à savoir sous forme libre ou sous forme estérifiée (esters éthylique et méthylique, diacylglycérol, triacylglycérol, phospholipide, esters de cholestérol...) sur leur biodisponibilité. De même, la position de l'acide gras sur le squelette glycérol module aussi cette biodisponibilité [98]. Dans

ce qui suit, nous focaliserons notre attention uniquement sur les études faisant intervenir les AGPI et notamment le DHA.

Des études ont rapporté que les AGPIs tels que l'EPA et le DHA sont mieux absorbés par l'organisme lorsqu'ils sont apportés sous forme de phospholipides que sous forme de triglycérides ou d'esters éthyliques [96]. De plus, l'ingestion d'une quantité suffisante de lipides dans un repas améliore l'efficacité de la digestion et de l'absorption des AGPIs. Cet effet positif sur la biodisponibilité est probablement dû à l'effet stimulant de la graisse sur la libération de lipases pancréatiques [99].

Une étude menée chez le porcelet a mis en évidence que lorsque le DHA est apporté par l'alimentation sous forme de phosphatidylcholine plutôt que de triglycérides, celui-ci est 1,9 fois plus représenté dans la matière grise à l'issue de la prise alimentaire. Une accumulation de DHA similaire a également été constatée dans les synaptosomes, le foie et les globules rouges [100].

Une étude menée sur la souris compare l'apport d'AGPI sous forme de triglycérides ou de phospholipides dans le cadre d'un régime obésogène. Sous les deux formes, l'apport d'AGPI permet de limiter la prise de poids. L'apport sous forme de phospholipides réduit l'insuline plasmatique. L'hypertrophie des adipocytes réduit la stéatose hépatique et l'inflammation du tissu adipeux blanc [101].

Hassem *et al.* (2016) ont testé l'incorporation du DHA sous différentes formes chimiques (non estérifié ; et estérifié sous forme de 1-acétyl-2-docosahéaénoylglycérophosphocholine et de 1-palmitoyl-2-docosahéaénoylglycérophosphocholine) *in vivo* sur un modèle murin lors d'injections intraveineuses avec des molécules marquées. Sous forme de lysophospholipides, le DHA est mieux absorbé par le cerveau. Cependant, ce n'est pas le cas pour le cœur qui ne semble pas à long terme favoriser une de ces 3 formes pour absorber le DHA. Au niveau du foie, le DHA apporté sous forme de phosphatidylcholine permet une meilleure absorption. Il faut noter que, dans cette étude, le DHA est systématiquement en position sn-2 [102].

La tête polaire influe également sur la biodisponibilité du DHA. Ainsi, une étude a démontré qu'entre de la docosahéaénoyl lysophosphatidylcholine (LPC DHA), de la PC DHA-DHA, du DHA lié à une sérine pour former une lysophosphatidylsérine (LPS) DHA ou une phosphatidylsérine (PS) DHA, la LPS DHA était la molécule permettant la meilleure incorporation du DHA dans le cerveau de fœtus de rat. En effet, la LPS DHA est mieux absorbée

par les intestins. Elle permet une ouverture des jonctions serrées en diminuant la résistance électrique transépithéliale, la rendant ainsi biodisponible [103].

2.6 Oxydation du DHA

Comme il a été mentionné précédemment (§ 1.6.1), le DHA, du fait de ses nombreuses insaturations, est particulièrement sensible à la peroxydation lipidique. Il a été démontré chez le rat que lorsque des AGPIs sont apportés par l'alimentation, le foie, afin de limiter la peroxydation lipidique, va produire en grand nombre d'enzymes antioxydantes telles que la catalase et la superoxyde dismutase [104].

Le lipide portant le DHA joue également un rôle sur l'oxydation. Une étude a montré que, à une température de 30°C et lorsque le DHA est lié, en position sn-1 ou sn-2, à un phospholipide ayant un groupe polaire contenant de l'azote tels que la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE), il n'y a pas formation d'hydroperoxyde. Dans un mélange contenant de la PC et du DHA non estérifié, l'oxydation de DHA est limitée mais de manière moins efficace que lorsque le DHA est estérifié sur la PC. En effet, plus le DHA est proche de la tête polaire, moins le risque de peroxydation est élevé. Aucun effet antioxydant n'a été observé lorsque le DHA est estérifié sur un triglycéride, et ce, sur toutes les positions du squelette glycérol [105].

2.7 Intérêt physiologique des phospholipides riches en DHA

La nature du ou des acides gras ainsi que du groupement polaire portés par le glycérol influence fortement les rôles physiologiques des phospholipides et des LPLs. Ainsi, selon leur structure chimique, ces lipides peuvent avoir des rôles physiologiques bénéfiques ou au contraire délétères. Concernant les rôles physiologiques bénéfiques, les études ont montré qu'ils sont surtout exprimés par les phospholipides (PLs) ou LPLs portant un acide gras à longue chaîne insaturée tel que le DHA.

Un régime riche en DHA sous forme de LPC DHA permet de réduire le cholestérol LDL (Low Density Lipoprotein) et VLDL (Very Low Density Lipoprotein), couramment nommés le «mauvais» cholestérol. Ils augmentent en contrepartie le cholestérol HDL favorisant la bonne santé cardiovasculaire [106]. D'autre part, la LPC DHA permettrait d'activer le métabolisme de détoxification du foie et de restaurer la muqueuse gastro-intestinale en améliorant ainsi son fonctionnement [107]. De plus, la LPC DHA présente une activité anti-inflammatoire en

inhibant la formation de cytokine pro-inflammatoire en réponse aux lipopolysaccharides, contrairement au DHA libre qui ne présente pas d'effet anti-inflammatoire [108].

Dans le cadre d'un dépôt de brevet, il a été démontré que la supplémentation alimentaire en DHA sous forme de phospholipides conduit à une amélioration de l'apport en O₂, non liée à une augmentation de l'hématocrite. Elle serait attribuable à une augmentation de l'insaturation des acides gras de la membrane des érythrocytes conduisant à une déformabilité accrue de cette dernière et à une réduction du volume globulaire moyen [109].

3 Modification enzymatique des lipides

Dans le premier paragraphe, les bienfaits d'un apport en DHA pour l'organisme ont été mis en avant. Le deuxième paragraphe quant à lui présente les avantages de l'apport de DHA sous forme de phospholipides. En effet, l'utilisation de phospholipides comme vecteur de DHA permet de protéger celui-ci de l'oxydation mais aussi d'augmenter sa biodisponibilité pour l'organisme lorsque celui-ci est ingéré. Ainsi, dans la dernière partie de cette étude bibliographique, les différentes modifications enzymatiques des lipides, et tout particulièrement des phospholipides, permettant de les enrichir en AGPI sont présentées.

La biocatalyse est définie comme l'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions biochimiques. Les enzymes sont des protéines complexes qui sont produites par des organismes vivants pour synthétiser des produits biochimiques spécifiques pour le maintien des fonctions cellulaires. Bien que les enzymes soient synthétisées par des organismes vivants, elles peuvent être extraites et utilisées à des fins industrielles, pharmaceutiques et pour des applications biotechnologiques. L'utilisation d'enzymes à l'échelle industrielle permet la mise en place de stratégies alternatives et écologiques pour la synthèse de composés en limitant l'utilisation de solvants et les dépenses énergétiques liées à la synthèse du composé d'intérêt. En effet, la biocatalyse est le plus souvent réalisée dans des conditions douces. De plus, les déchets produits sont moins nombreux et surtout moins toxiques.

Pour la modification des lipides, deux classes d'enzymes sont utilisées : les lipases et les phospholipases. Dans ce chapitre, la présentation de ces deux classes d'enzymes sera suivie d'une revue de littérature récapitulant l'ensemble des travaux impliquant ces enzymes et les réactions conduisant à la synthèse de phospholipides structurés.

3.1 Les lipases

Les lipases ou acylglycérol acylhydrolases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes hydrolytiques qui ont pour fonction première d'hydrolyser les liaisons esters carboxyliques des triglycérides. Ce sont des enzymes retrouvées chez tous types d'organismes : végétaux, animaux et microorganismes. La particularité des lipases réside dans leur capacité à hydrolyser un substrat peu ou pas soluble en milieu aqueux.

De ce fait, elles sont largement utilisées en biotechnologies car elles présentent de nombreux avantages : elles sont stables dans les solvants organiques, elles ne nécessitent pas de cofacteurs, ont un faible coût et sont faciles à extraire [110].

3.1.1 Structure des lipases

La majorité des lipases ont une structure tridimensionnelle semblable. Leur structure consiste en un repliement α/β : le noyau est constitué d'un feuillet β parallèles dont les brins sont reliés entres-eux par des hélices α amphiphiles (Figure 12). La triade catalytique est composée d'un nucléophile (résidu de sérine activé par une liaison hydrogène) en relais avec une histidine et un aspartate ou glutamate.

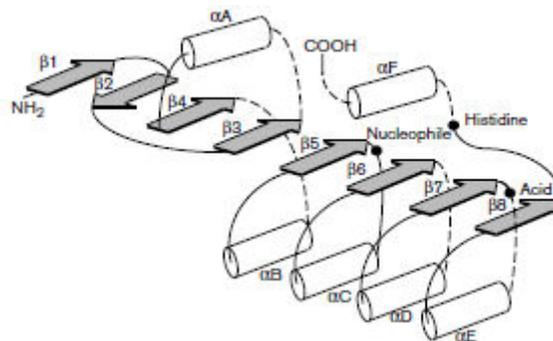


Figure 12 : Structure d'une hydrolase, schéma du repliement α/β . L'emplacement de la triade catalytique est indiqué par les points noirs [111]

Certaines lipases présentent une boucle peptidique amphiphile couvrant le site actif de l'enzyme, cette boucle s'apparente à un couvercle. Ce volet, situé à côté du site actif, présente une partie hydrophile à la surface et une partie hydrophobe à l'intérieur. Cette conformation est dite fermée ou inactive car le volet empêche toute interaction entre le milieu externe et le site actif. Le changement de conformation de la lipase vers sa forme ouverte permet de libérer l'entrée du site catalytique et la liaison au substrat. Cette conformation est dite active ou ouverte, elle est stabilisée par des forces de faibles énergies (Van der Waals) avec 2 boucles, appelées $\beta 5$ et $\beta 9$. Il est alors question d'activation interfaciale de la lipase (Figure 13).

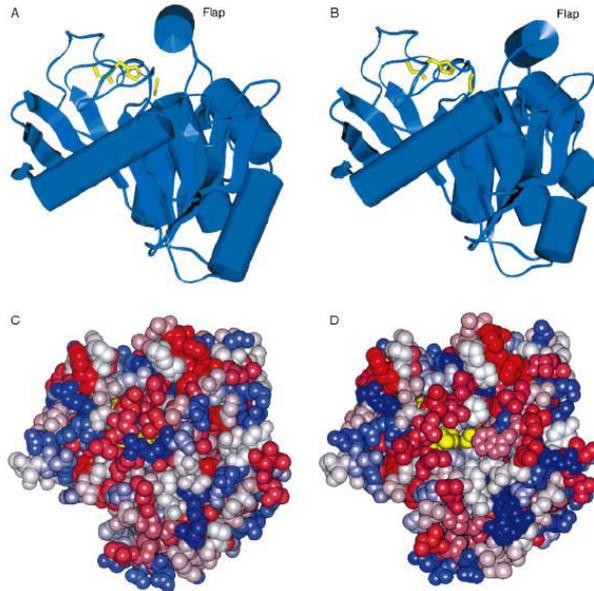


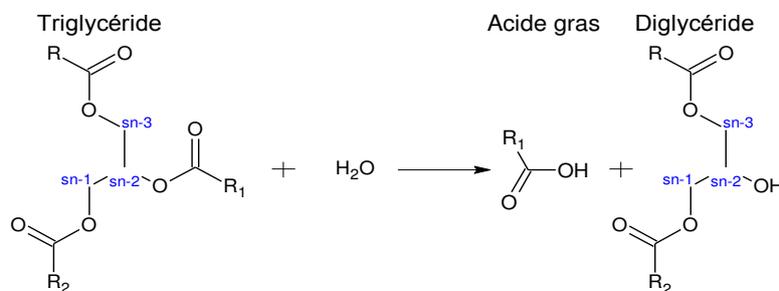
Figure 13 : Structure de la lipase de *Mucor miehei* dans sa forme fermée (A, C) et dans sa forme ouverte (B, D). A et B (vue latérale) : le site catalytique (jaune). C et D (vue du dessus). Les couleurs indiquent une polarité décroissante (bleu foncé, bleu clair, blanc, rouge clair et rouge foncé)[112]

3.1.2 Réactions catalysées

Selon les conditions opératoires, les lipases peuvent catalyser deux types de réactions, l'hydrolyse et la synthèse.

3.1.2.1 L'hydrolyse

L'hydrolyse est la réaction « naturelle » des lipases. Cette réaction hydrolyse des liaisons esters en milieu aqueux. Elle mène à l'obtention de diglycérides, monoglycérides et acides gras libres à partir de triglycérides et autres esters, leur substrat naturel. Cependant, certaines lipases ont également la capacité de réaliser cette hydrolyse sur les phospholipides. Dans tous les cas, cette réaction s'effectue à l'interface entre le substrat hydrophobe et le milieu aqueux.

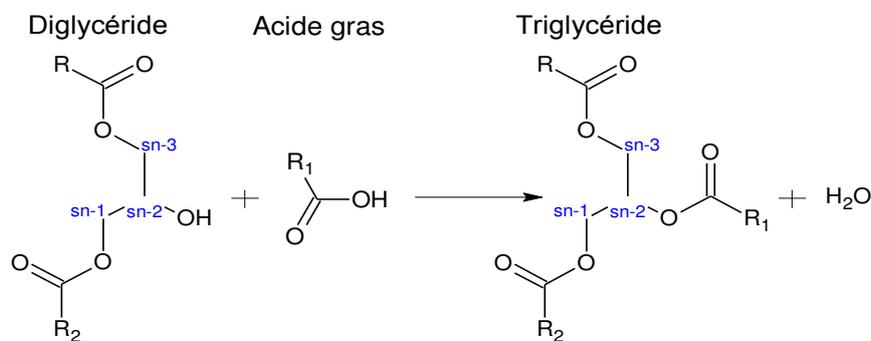


3.1.2.2 La synthèse

Les lipases peuvent catalyser la synthèse de molécules soit par formation de liaison ester avec le squelette glycérol, soit par transfert d'acyle au niveau de cette liaison. L'ensemble des réactions de synthèse réalisée par les lipases est présenté dans ce paragraphe.

L'estérification

Lorsque l'équilibre de la réaction est déplacé, la réaction obtenue est une estérification. Cette réaction a lieu lorsque l'enzyme est dans un milieu peu hydraté, en présence ou non de solvants organiques. Pour favoriser l'estérification, il est nécessaire d'éliminer l'eau synthétisée au cours de la réaction. Cependant, une trop faible teneur en eau entraîne des diminutions des rendements de synthèse car l'eau joue un rôle dans la structure du biocatalyseur [113].

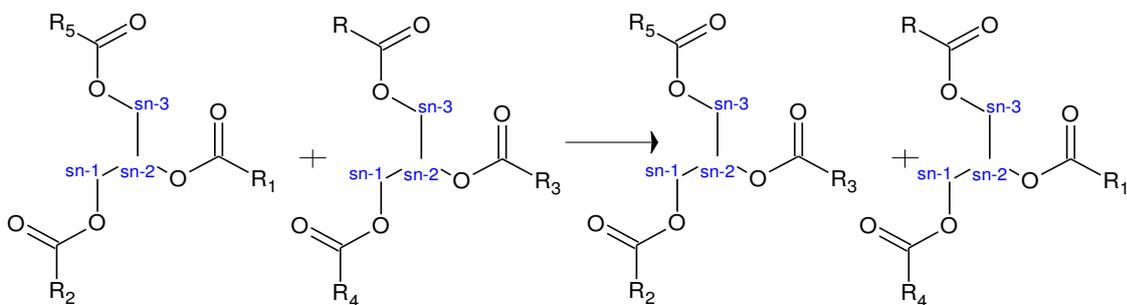


La transestérification

La transestérification est un transfert d'acyle entre un ester et une autre molécule (ester, alcool, ou acide). La transestérification se divise en trois réactions : l'interestérification, l'alcoololyse et l'acidolyse.

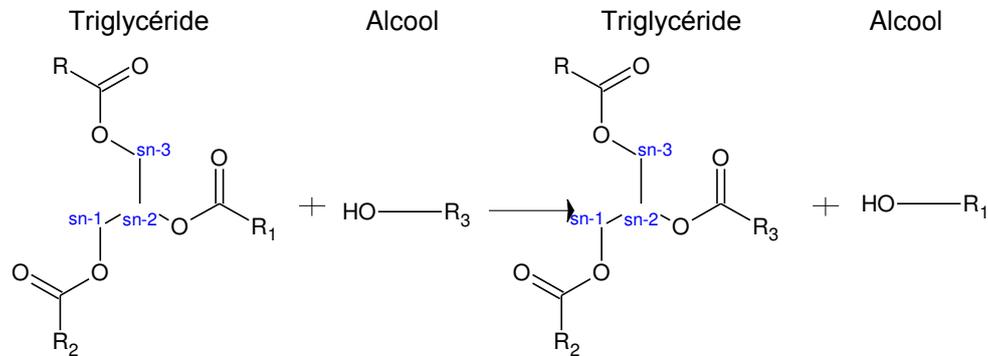
L'interestérification

L'interestérification permet la synthèse d'esters à partir de deux esters, par l'échange de leurs acyles.



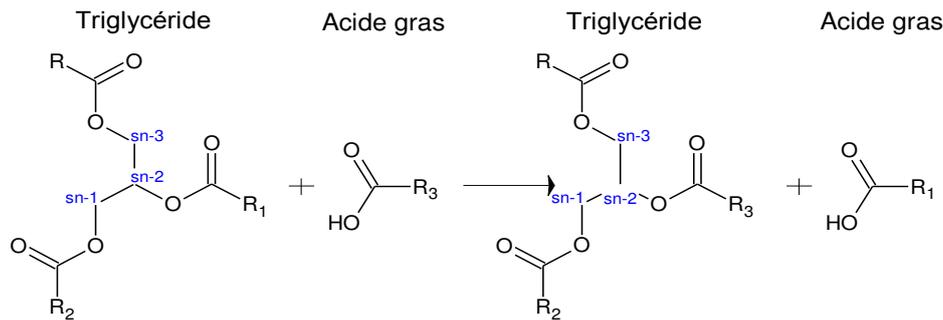
L'alcoolyse

L'alcoolyse est la synthèse d'esters à partir d'un ester et d'un alcool. La déacylation du complexe enzyme-substrat est assurée par un alcool.



L'acidolyse

L'acidolyse est la synthèse d'ester à partir d'un ester et d'un acide gras. Un acide gras libre est échangé avec l'acyle d'un ester.



3.1.3 Facteurs influençant les réactions

Du fait de la structure, du mécanisme catalytique et de l'activation des lipases, les réactions de synthèse et d'hydrolyse vont être modulées par différents paramètres, tels que le milieu réactionnel, la température, l'activité de l'eau, le rapport molaire, la nature de l'enzyme.

3.1.3.1 Le milieu réactionnel

La présence d'un solvant organique ainsi que sa nature peut largement affecter la catalyse d'une enzyme. En effet, l'utilisation d'un solvant organique peut conduire à l'inhibition de l'enzyme. La polarité du solvant organique est un facteur important quant à la capacité de l'enzyme à catalyser la réaction attendue. La polarité d'un solvant définie par la valeur log P est mesurée au moyen du coefficient de partage (P) d'un solvant entre l'octanol et l'eau.

L'activité catalytique des lipases dans un solvant ayant un log P inférieur à 2 est généralement inférieure à celle des lipases placées dans un solvant ayant un log P supérieur à 2. Cela est dû au fait que les solvants polaires peuvent pénétrer dans le noyau hydrophile de la protéine et altérer la structure fonctionnelle tout en éliminant l'eau du site catalytique tandis que les solvants hydrophobes permettent de maintenir le taux d'hydratation nécessaire au bon fonctionnement du site catalytique [114].

Il est également possible de réaliser la catalyse dans des milieux fondus, c'est-à-dire exempts de solvant. Dans ce cas, les substrats jouent le rôle de solvant. Ces réactions en milieu fondu présentent un intérêt majeur quant aux applications, à l'impact environnemental de la réaction et des risques pour les manipulateurs. En se plaçant d'un point de vue industriel, cela permet d'augmenter les concentrations en réactifs et ainsi de traiter de plus grandes quantités de substrats en maintenant de faibles volumes réactionnels [115].

3.1.3.2 [La température](#)

La température est un facteur qui influence les réactions enzymatiques. En effet, l'énergie transmise au complexe lipase-substrat par la température du milieu est répartie statistiquement entre les molécules du complexe qui y sont dissoutes. Plus la quantité d'énergie ainsi transmise est grande, plus nombreux seront les complexes enzymes substrat activés où la réaction enzymatique va se produire. Une trop faible température mène à une absence de réaction ou une réaction lente. En revanche, une température trop élevée peut conduire à une dénaturation des protéines. La température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40°C mais beaucoup gardent une forte activité à des températures supérieures. De manière générale, les lipases microbiennes sont plus thermostables que les lipases d'origine végétale ou animale [116]. De plus, en milieu fondu, la température réduit fortement la viscosité du milieu en améliorant donc l'agitation et l'homogénéisation des substrats dans le milieu.

3.1.3.3 [Activité de l'eau](#)

L'activité thermodynamique de l'eau est impliquée dans les niveaux d'hydratation des différents acteurs de la synthèse à savoir l'enzyme, les substrats et le solvant. En effet, la majorité des lipases ont besoin d'un seuil minimal d'hydratation permettant l'activation interfaciale, lorsque la concentration micellaire critique est atteinte, les lipases situées à l'interface de la phase eau/lipide voient leur activité augmenter. Cela est lié à l'ouverture du

volet de la lipase [117]. Toutefois, une trop grande quantité d'eau mène à une réaction d'hydrolyse [118]. Selon la réaction étudiée, les optimums d'activité de l'eau sont différents.

La valeur de l'activité de l'eau varie entre 0 (produit sec au point que toute l'eau est liée au substrat et à l'enzyme, et donc sans qualité réactive) et 1 (eau pure et sans soluté). L'activité de l'eau (a_w) correspond au rapport entre la pression de la vapeur d'eau du produit considéré (pression de la vapeur d'eau à la surface du produit) et la pression de la vapeur d'eau pure à la même température. L'activité de l'eau est ajustée par l'utilisation d'hydrates de sel.

Pérignon *et al.* ont démontré que lors d'une réaction d'interestérification entre de la tricapryline et de la trimyristine, l'activité enzymatique de la lipase TL-IM issue de *Thermomyces lanuginosa* était optimale pour une a_w de 0,75. Des a_w plus faibles conduisent à une augmentation du temps de synthèse pour obtenir le même rendement, voire même diminuent celui-ci. Cependant, selon cette même étude, le constat n'est pas le même pour la lipase Novozym 435 issue de *Candida antarctica* (CAL B immobilisée) où l'activité de l'eau n'a pas d'influence sur le rendement de synthèse [119].

3.1.3.4 [Rapport molaire](#)

L'une des variables affectant le rendement de synthèse des réactions catalysées par les lipases est le rapport molaire entre les substrats. L'acidolyse partielle d'un phospholipide requiert une mole d'acide gras pour une mole de phospholipide. Cependant, par la loi d'action de masse, un excès important d'acides gras permet de déplacer la réaction dans le sens de la formation du phospholipide structuré attendu. De plus, les réactions étudiées se faisant dans un milieu fondu, les acides gras font office de solvant, ainsi, lors de l'utilisation de certains acides gras ayant une viscosité plus faible que le deuxième substrat, l'agitation est améliorée.

3.1.3.5 [Immobilisation de l'enzyme](#)

Les lipases peuvent être utilisées sous forme libre ou immobilisée. L'immobilisation ou non de l'enzyme joue un rôle très important sur l'activité, la stabilité et parfois sur la spécificité de l'enzyme [120].

L'immobilisation présente de nombreux avantages car elle améliore souvent la stabilité thermique des biocatalyseurs. Elle facilite la réutilisation des enzymes et la purification des produits, ce qui conduit à des économies de réactifs. Cependant, l'immobilisation peut également provoquer une inactivation de l'enzyme et, comme dans tous les cas de catalyse hétérogène, les limitations de transfert de masse peuvent entraîner une diminution de l'activité

spécifique de l'enzyme. Les molécules d'enzyme au milieu des particules de support sont exposées à une concentration de substrat inférieure à celle d'une enzyme non immobilisée. Cela a pour conséquence théorique, une vitesse de réaction plus faible [121].

Différents types d'immobilisation peuvent être mis en œuvre et sont présentés sur la Figure 14.

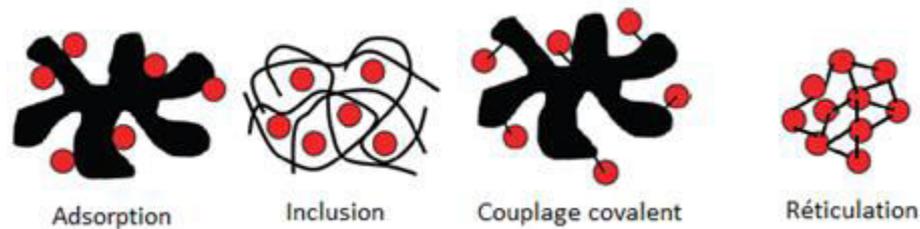


Figure 14 : Schéma représentant les méthodes d'immobilisation enzymatique (● : enzyme ; * : support) d'après Adlercreutz [121]

L'adsorption est la méthode d'immobilisation la plus simple à mettre en œuvre. Une solution enzymatique est mise en contact avec un matériau support et si les interactions enzymes-support sont suffisamment fortes, une adsorption se produit. Dans le cas des lipases, le plus souvent c'est une liaison hydrophobe qui est mise en jeu mais cette liaison peut également être ionique. Cette méthode fait intervenir des liaisons non covalentes ou secondaires ayant de bas niveaux énergétiques. Il n'est pas rare que les enzymes se décrochent du support.

L'immobilisation par inclusion consiste à inclure les molécules d'enzyme dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau. Plusieurs polymères, comme l'alginate, le chitosan, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon, sont utilisés dans cette technique.

Le couplage covalent est la méthode d'immobilisation la plus utilisée. Cependant, cette méthode d'immobilisation peut conduire à une inactivation totale de la lipase si le site actif est modifié par la liaison covalente.

L'immobilisation par réticulation consiste en l'association des différentes unités biocatalytiques ou de protéines à l'aide d'un agent réticulant. Elle peut être effectuée après inclusion ou adsorption afin de stabiliser l'enzyme immobilisée et limiter les phénomènes de fuites ou de désorption de l'enzyme [121].

3.1.4 Sélectivité des lipases

Les lipases sont capables de catalyser plusieurs réactions mais elles peuvent également agir plus ou moins efficacement sur différents substrats. Elles sont donc sélectives. La littérature

distingue 5 types de sélectivité : la sélectivité de substrat, la régiosélectivité, la typosélectivité, la stéréosélectivité et la sélectivité de réaction. La sélectivité des lipases leur donne un atout fort car elle permet la synthèse de molécules dont la synthèse chimique est difficile ou conduisant à des formes secondaires non souhaitées (énantiomères purs, position sur le squelette glycérol).

3.1.4.1 [La sélectivité de substrat](#)

Les lipases peuvent avoir une préférence pour une forme particulière d'acylglycérol, il est alors évoqué la sélectivité de substrat. Les triglycérides représentent le substrat naturel des lipases, cependant, certaines préféreront d'autres substrats tels que les phospholipides, les diacylglycérols, les monoacylglycérols, les glycolipides ou encore d'autres esters.

Pour les lipases comportant un volet, la sélectivité de substrat serait notamment due à la nature de ce volet couvrant le site catalytique. En effet, en échangeant les couvercles des sites catalytiques de certaines lipases, il est possible d'échanger leur sélectivité de substrat [122].

3.1.4.2 [La régiosélectivité](#)

La régiosélectivité ou sélectivité de position d'une enzyme est sa capacité à discriminer les positions externes (sn-1 et sn-3) de la position interne (sn-2) du squelette glycérol. Pour les phospholipides, seules les positions sn-1 et sn-2 sont considérées, la position sn-3 portant la tête polaire. Malgré la diversité des réactions réalisées par les lipases, leur régiosélectivité reste constante [123].

Ainsi, il a été démontré que la lipase des triglycérides adipeux, lipase retrouvée chez les mammifères et qui permet d'initier l'hydrolyse des triglycérides en diacylglycérol, hydrolyse préférentiellement la position sn-2 des triglycérides. Cependant, en présence d'un cofacteur (CGI-58), celle-ci a la capacité d'hydrolyser la position sn-1 [124].

La lipase A issue de *Candida antarctica* (CAL A) est l'une des rares avec la lipase issue de *Burkholderia cepacia* qui catalyse préférentiellement l'alcool secondaire situé en position sn-2 [125],[126].

3.1.4.3 [La stéréosélectivité](#)

Lorsque les acides gras occupant les positions sn-1 et sn-3 d'un triglycéride ne sont pas les mêmes, le carbone central est alors asymétrique. Les carbones du squelette glycérol sont numérotés en utilisant la nomenclature « sn » qui signifie « stereospecifically numbered ». Une

lipase stéréosélective permet de distinguer les positions soit sn-1, soit sn-3 du triglycéride. Ceci est particulièrement intéressant pour l'obtention de molécules chirales et pour la résolution de racémiques.

3.1.4.4 [La typosélectivité](#)

La typosélectivité ou sélectivité d'acides gras peut être associée à une forme particulière de sélectivité de substrat. Elle désigne l'aptitude des lipases à se montrer sélectives vis-à-vis d'un acide gras ou d'un groupe d'acides gras particulier.

Ainsi, il a été démontré que Novozym 435 a une sélectivité plus importante pour l'acide pinoléique (C18:3 ω 6 5z, 9z, 12z), puis l'acide linoléique conjugué et enfin l'acide linoléique lors de la phase initiale d'une réaction d'estérification avec un glycérol [127]. Une étude portant sur une lipase digestive de saumon a démontré la sélectivité de cette lipase pour des acides gras de courtes chaînes telles que l'acide butanoïque et l'acide hexanoïque lors d'une réaction d'hydrolyse [128]. Cette discrimination peut se faire vis-à-vis des AGPIs. Une étude portant sur l'alcoolyse d'une huile de poisson contenant de l'EPA et du DHA démontre que parmi 8 préparations enzymatiques testées, les lipases issues de *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae* et *Rhizomucor miehei* montrent une sélectivité envers l'EPA. Novozym 435 ne montre pas de sélectivité particulière tandis que la lipase issue de *Alcaligenes sp.* est sélective envers le DHA [129]. Les lipases isolées des organismes marins montrent généralement une typosélectivité inhabituelle. Lie et Lambertsen ont observé que le mélange d'enzymes brut recueilli à partir de l'intestin de morue hydrolysait préférentiellement les acides gras ω 3 [130]. Une sélectivité similaire a également été observée à partir du jus digestif collecté dans la zone pylorique de l'estomac du saumon et de la truite arc-en-ciel [131]. Enfin, une étude récente a rapporté qu'une nouvelle lipase isolée du microorganisme marin *Marinobacter lipolyticus* montre une forte préférence pour l'hydrolyse d'EPA à partir de l'huile de poisson [132].

3.1.4.5 [Sélectivité de réaction](#)

Le choix de la lipase est important par rapport à la réaction étudiée, en effet les lipases peuvent présenter une sélectivité de réaction. Ainsi, il a été démontré que pour l'obtention d'oléyl-lysophosphatidylcholine par estérification, il est préférable d'utiliser RM-IM, lipase immobilisée issue de *Rhizomucor miehei*, plutôt que TL-IM ou Novozym 435 [133]. Une autre étude portant sur l'hydrolyse des phospholipides d'*Isochrysis galbana* met en évidence que la réaction est réalisée avec des rendements élevés par les lipases PS issue de *Burkholderia*

cepacia, TL-IM, Novozym 435 ainsi que par RM-IM mais que Novozym 435 présente de faibles taux de conversion [76]. Enfin, dans le cadre d'une alcoololyse de phosphatidylcholine dans le but d'obtenir des lysophospholipides, Novozyme 435 a permis d'obtenir des meilleurs rendements que les lipases RM-IM et TL-IM [134].

Il faut noter que certaines lipases très efficaces pour catalyser des réactions d'estérification ne le seront pas pour la réaction inverse, l'hydrolyse. Il a été démontré que pour la lipase pancréatique de porc, l'activité hydrolytique était de $8,6 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ contre une activité pour l'estérification de $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour la lipase issue de *Candida rugosa* immobilisée sur du chitosan, la réaction d'estérification ($83,3 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) permet d'atteindre une activité enzymatique doublée par rapport à celle de l'hydrolyse ($42,7 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) [135].

Le caractère sélectif des lipases est très intéressant à exploiter. En effet, il est possible de combiner plusieurs sélectivités pour obtenir les produits de synthèse d'intérêt. Ainsi, lors d'une réaction impliquant un mélange de substrats composé d'AGPIs et de triglycérides portant des acides gras insaturés dans le but d'obtenir des triglycérides enrichis en AGPI, l'utilisation d'une lipase favorisant l'incorporation par acidolyse d'AGPI permettra d'augmenter les rendements de synthèse par rapport à une lipase non sélective. En effet, il y aura dans le milieu une accumulation d'acides gras saturés ; la lipase typosélective s'orientera préférentiellement vers l'acidolyse des AGPI au détriment des acides gras saturés. Une autre réaction pourrait avoir lieu dans ce même mélange enzymatique, à savoir une interestérification entre les acides gras portés par les triglycérides. Dans ce cas, la sélectivité de réaction va avoir un rôle important dans la synthèse du produit souhaité.

Dans d'autres cas, il peut être intéressant d'utiliser la typosélectivité liée à la régiosélectivité. Dans le but d'obtenir des lysophospholipides riches en DHA à partir de phospholipides microalgaux issus d'*Isochrhysis galbana* où les AGPIs sont estérifiés en position sn-2, il va falloir utiliser une enzyme régiosélective afin d'hydrolyser la position sn-1 uniquement. Or, lors de la réaction, il peut y avoir migration des chaînes acylées de la position sn-2 à la position sn-1 lorsque celle-ci n'est pas estérifiée. Il sera alors intéressant de favoriser une lipase typosélective discriminant les AGPIs [76][136].

3.1.5 Applications des lipases

Le nombre de lipases disponibles a considérablement augmenté depuis les années 1980. Cette augmentation résulte principalement des progrès réalisés dans le clonage et l'expression d'enzymes provenant de microorganismes. Elles présentent de nombreuses applications dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire, l'industrie des pâtes à papier, l'industrie textile, la cosmétique ou la pharmacologie [137]. Les lipases représentent le 3^{ème} groupe le plus important d'enzymes d'intérêt industriel, après les carbohydrases et les protéases [138]. Contrairement à une synthèse chimique, l'utilisation des lipases permet de diminuer les réactions secondaires et les problèmes de séparations post-réaction grâce à leur sélectivité.

Les enzymes lipolytiques servent en tant qu'additifs dans la fabrication de détergents. Elles sont utilisées pour leur capacité à hydrolyser les lipides. Elles permettent de diminuer l'impact environnemental de ces détergents en abaissant les températures de lavage et en limitant l'utilisation de produits chimiques.

Leur capacité à hydrolyser les lignines ou les hydrocarbures est également exploitée dans l'industrie des pâtes à papier ou encore dans le traitement des effluents avant leur rejet dans l'environnement. Dans le domaine des pâtes à papier, elles sont utilisées comme agent de blanchiment par élimination des lignines.

Les effluents de certaines industries peuvent être composés d'hydrocarbures ou d'huile en provenance d'entreprises de restauration. Un traitement par les lipases de ces effluents facilite la dégradation des déchets par la biomasse bactérienne lors de la biorestauration de ces effluents. Pour le traitement du cuir et du textile, elles vont limiter l'utilisation de produits nocifs pour l'environnement tels que les solvants ou des milieux à pH basique.

L'interestérisation peut être exploitée pour modifier la teneur en un acide gras particulier d'une huile. Ainsi, la conversion de l'huile de palme en substitut de beurre de cacao est obtenue par interestérisation. En utilisant l'interestérisation, une matière première peu coûteuse, ici l'huile de palme, est convertie en équivalent de beurre de cacao, qui a une valeur ajoutée élevée et qui est largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour améliorer la texture en bouche de certains produits tels que le chocolat. Elles permettent également le développement d'arômes et de saveurs dans des produits d'intérêts tels que le vin, le fromage, les saucisses ou le thé noir.

Certaines lipases sont stéréosélectives et peuvent alors être utilisées pour résoudre des mélanges racémiques ou la synthèse d'éléments constitutifs chiraux pour les produits pharmaceutiques, les produits agrochimiques et les pesticides. La chiralité est un facteur clef de l'efficacité de nombreux médicaments. Ainsi, la production d'un seul énantiomère d'une molécule de base pour la fabrication d'un médicament est largement employée par l'industrie pharmaceutique [139].

Enfin, les lipases sont utilisées dans la production de biodiesel permettant de pallier l'utilisation des énergies fossiles dont la combustion produit de l'oxyde de soufre ce qui n'est pas le cas des biocarburants. Le biodiesel est un biocarburant liquide composé d'esters d'acides gras à longue chaîne et d'alcools à chaîne courte. Les molécules de biodiesel sont synthétisées par transestérification directe d'huiles végétales et de graisses à base d'alcools à chaîne courte comme le méthanol et l'éthanol en présence de catalyseurs appropriés [140].

3.2 Les phospholipases

Les enzymes ayant pour substrat naturel des phospholipides sont nommées les phospholipases. *In vivo*, les phospholipases jouent un rôle important dans la régulation cellulaire, le métabolisme et la biosynthèse des phospholipides. Il existe quatre grandes classes de phospholipases (A, B, C et D) selon la spécificité envers une ou deux des quatre liaisons esters des phospholipides (Figure 15).

Les phospholipases de type A1 (PLA1 ; EC 3.1.1.32) catalysent l'hydrolyse de la liaison ester en position sn-1 donnant ainsi un lysophospholipide sur lequel l'acide gras est porté par la position sn-2. Elles peuvent également réaliser des réactions de synthèse.

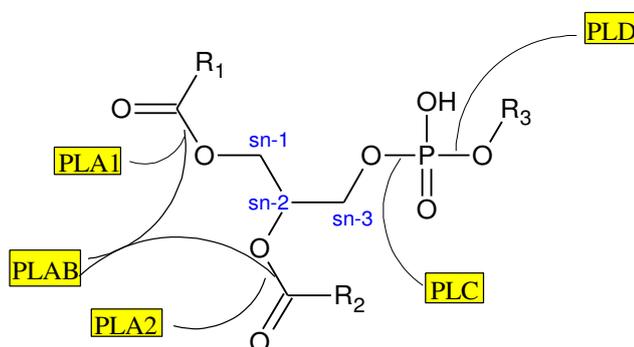


Figure 15 : Sites d'actions des phospholipases

Les phospholipases de type A2 (PLA2; EC 3.1.1.4) catalysent en milieu aqueux l'hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 formant donc un 2-LPC (avec l'acide gras porté par la position sn-1). Tout comme les PLA1, les PLA2 sont capables de réaliser des réactions de synthèse [141].

Les phospholipases B hydrolysent ou synthétisent indifféremment les liaisons esters des acides gras en position sn-1 ou sn-2 du phospholipide. Lorsque le milieu est non-aqueux, les phospholipases tout comme les lipases ont la capacité de réaliser des réactions de synthèse sur la position du squelette pour laquelle elles sont sélectives.

Les phospholipases C (PLC; EC 3.1.4.3) et D (PLD; EC 3.1.4.4) sont des hydrolases du diester phosphorique. La phospholipase C intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate donnant un diglycéride et un groupement phosphorylé. La phospholipase D intervient sur la fonction ester liant le phosphate au groupement polaire, donnant un acide phosphatidique d'une part et le groupement polaire d'autre part.

Pour la conversion d'une classe de phospholipides en une autre, la transphosphatidylase est catalysée par les PLD. Cette réaction permet la production industrielle de phospholipides non naturels ou peu abondants pouvant être utilisés en nutraceutique ou pharmaceutique. En effet, cela permet la formation par exemple de liposomes stériquement stabilisés. Autrement, le principe actif d'un médicament peut être lié au groupement polaire des phospholipides. Ainsi, ces phospholipides jouent le rôle de promédicaments, en effet, les PLD de l'organisme permettent la libération par hydrolyse du principe actif *in vivo* [142].

3.3 Synthèse de phospholipides structurés

La modification des acyles portés par les phospholipides peut être réalisée par des lipases ou des phospholipases. La Figure 16 présente les différentes voies de synthèse catalysée par les lipases et phospholipases pour la modification de phosphatidylcholines. Les réactions d'hydrolyse, d'interestérisation et d'estérisation sont présentées dans cette figure. Il y est également représenté la modification spontanée des phospholipides par la migration des chaînes acylées ainsi que la transphosphatidylase. Ce paragraphe présente un résumé des réactions publiées dans la littérature.

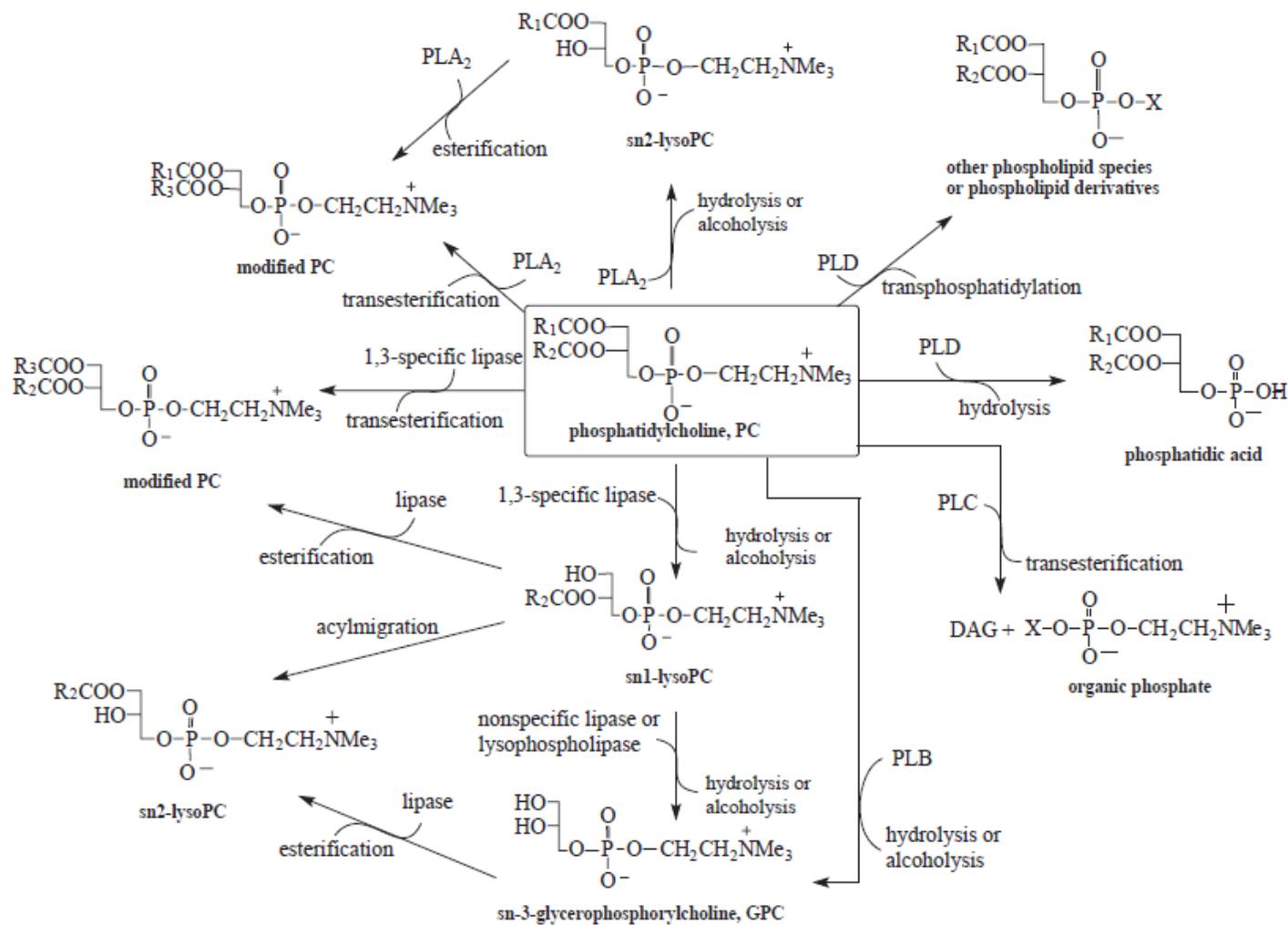


Figure 16 : Modification de la phosphatidylcholine par des lipases et phospholipases [141]

3.3.1 Modification par des phospholipases

Les phospholipases sont utilisées industriellement pour modifier les phospholipides. Ces modifications comprennent principalement l'hydrolyse des phospholipides, la synthèse de phospholipides spécifiques et la conversion d'une classe de phospholipides en une autre par transestérification ou interestérification.

3.3.1.1 Hydrolyse

Mingarro *et al.* (1994) [143] ont démontré que l'hydrolyse de phospholipides par la PLA2 est sélective en fonction de la tête polaire en milieu aqueux ou non. Dans du chloroforme saturé en eau, la PC est rapidement hydrolysée en lysophosphatidylcholine, tandis que le phosphatidylinositol (PI) est hydrolysé beaucoup plus lentement. La phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG) et la phosphatidylsérine (PS) présentent un degré d'hydrolyse faible même après plusieurs jours d'incubation. Dans une expérience parallèle réalisée en milieu aqueux, l'ordre de l'hydrolyse est PS>PG>PI>PC>PE.

3.3.1.2 Estérification

Pour la synthèse de phospholipides structurés par estérification, les PLA2 sont largement utilisées. Le Tableau 6 dresse les réactions d'estérification retrouvées dans la littérature, les synthèses présentées ont pour substrat un lysophospholipide. Il n'a pas été trouvé de synthèse à partir de GPC mettant en œuvre la phospholipase PLA2. PLA1 a été utilisée seule pour estérifier de l'acide oléique (C18:2) sur de la GPC afin d'obtenir des lysophospholipides, le rendement en lysophosphatidylcholine obtenue est de 8% [144].

La PLA2 a été utilisée pour réaliser, à partir de LPC, la synthèse de phosphatidylcholine estérifiée en position sn-2 avec différents acides gras. L'utilisation de PLA2 permet de cibler la position de l'acide gras en position sn-2 du glycérol [145]. Dans une étude menée par Lux *et al.*, la PLA2 provenant de deux sources différentes, à savoir du venin d'abeille et du pancréas de porc, a été utilisée afin d'estérifier en position sn-2 d'un 1-palmitoyl-2-lyso-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine, un acide oléique. Les taux de conversion les plus importants ont été obtenus par la phospholipase issue de pancréas de porc [146].

Tanaka *et al.*, ont synthétisé des phospholipides structurés enrichis en AGPI. Ils ont estérifié du DHA et de l'EPA sur des lysophospholipides à l'aide d'une PLA2 issue de pancréas de porc. Lors de cette étude, il a été mis en avant que la présence d'acides aminés dans le mélange

réactionnel, tel que la glycine ou la L-alanine, jouant ici le rôle de solvant, améliore les rendements de synthèse [147].

Tableau 6 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par estérification à l'aide de phospholipases

Enzyme (source)	Immobilisation	Donneur d'acyle	Source de lysophospholipide	Solvant	Rendement PC (%)	Référence
PLA2 (venin de <i>Naja naja</i>)	Non	C18:1	Jaune d'œuf	Toluène	6,5	[148]
PLA2 pancréatique	Non	C22:6	Jaune d'œuf	Isooctane	34,6	[149]
PLA2 pancréatique	Oui	C18:1	Jaune d'œuf	Benzène	35	[143]
PLA2	Oui	AGPI (40% C20:5-30% C22:6)	Jaune d'œuf Soja	Propane	26	[150]
PLA2 pancréatique	Oui	C18:1	Jaune d'œuf	Toluène	60	[145]
PLA2	Non	C18:1 DHA (54.9%) EPA (99%)	Soja	Glycine (Gly) Gly+L-alanine Gly+L-alanine	63,3 19 49	[147]
PLA2 (venin d'abeille)	Non	C18:1	1-palmitoyl-2-lyso-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine	Méthanol	50	[146]
PLA2 (pancréas de porc)					87	

3.3.1.3 Transestérification

Li *et al.* [151] ont synthétisé de la phosphatidylcholine riche en DHA et EPA par le biais d'une transestérification de la phosphatidylcholine de soja avec des esters éthyliques de DHA et d'EPA à l'aide d'une PLA1. Ils ont obtenu une incorporation de 19,05% d'AGPI dans les phospholipides. Cette étude a permis de démontrer que l'addition d'eau présente l'effet le plus significatif sur cette réaction. La mise sous vide à 1,5 mmHg afin de limiter la présence d'eau dans le milieu réactionnel est appliquée après 24h. Il semblerait que l'ajout d'eau en début de réaction favorise celle-ci mais que par la suite, elle la pénalise. Les rendements de synthèse à 72h sont légèrement améliorés (de 26,26% à 30,31%) et l'apparition de LPC et GPC est limitée. Une autre étude s'intéressant à l'incorporation d'acide caprylique à l'aide d'une PLA2 dans de la phosphatidylcholine a été réalisée dans un milieu solvaté. Le rendement de synthèse était de 87,7% en présence d'hexane. Cependant l'acide caprylique était porté soit par la position sn-1, soit par la position sn-2. En effet, la migration des chaînes acylées après la synthèse modifie l'emplacement de l'acide caprylique. Cette migration est atténuée lorsque la réaction se déroule dans un milieu solvaté par du méthanol, cependant la réaction de transestérification est moins efficace dans ce solvant que dans l'hexane ou du diethyl-éther [152].

La synthèse enzymatique de phosphatidylcholine comprenant de l'acide décanoïque et de l'acide hexanoïque a également été étudiée. Cette synthèse a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, afin de placer l'acide hexanoïque en position sn-2, le phospholipide natif a été hydrolysé par une PLA2 puis estérifié par cette même enzyme. Ensuite, les auteurs ont procédé de la même manière pour modifier l'acyle en position sn-1, en réalisant l'enchaînement d'une hydrolyse puis d'une estérification mais cette fois-ci par une lipase pour remplacer l'acide gras en position sn-1 par un acide décanoïque [153].

Enfin, Vikbjerg *et al.* [154] ont modifié l'acyle porté en position sn-2 de la lécithine de soja par de l'acide caprylique en mettant en œuvre une réaction d'acidolyse avec la PLA2. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un plan d'expériences. Les deux facteurs clés de cette réaction sont la température de la réaction et la quantité d'eau présente dans le milieu. Le rendement maximal obtenu est de 36%. L'acide linoléique ainsi que le DHA ont été également testés comme donneurs d'acyle lors de cette étude et les rendements respectifs des réactions étaient de 30 et 20%.

Alors que l'échange d'acyl à la position sn-2 peut être effectué en utilisant des PLA2, pour l'échange en position sn-1, les lipases régiosélectives sn-1 et sn-3 sont souvent préférées aux

PLA1 [155]. Cette application est notamment utilisée en nutraceutique pour la production industrielle de phospholipides structurés.

Le Tableau 7 présente les différentes études utilisant des phospholipases pour la synthèse par acidolyse de phospholipides structurés. Les articles considérés dans cette revue présentent leurs résultats différemment. Afin de comparer les réactions mises en œuvre, les articles ont été exploités en calculant le rendement de synthèse de l'acidolyse lorsque cela était possible. Le calcul appliqué est le suivant :

$$\text{Rendement} = (\% \text{ d'incorporation de l'AG d'intérêt} \times \% \text{ de phospholipides}) / 100$$

Ce calcul permet d'exclure l'incorporation des acides gras dans les lysophospholipides qui ne sont pas les produits d'intérêts lors de l'acidolyse de phospholipides. Les systèmes étudiant l'incorporation d'AGPI sont nombreux mais les rendements restent toujours faibles. Dans certaines publications, les pourcentages de LPC et de PC ne sont pas précisés. Le rendement ne peut donc pas être calculé.

Tableau 7 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par acidolyse à l'aide de phospholipases

Enzyme (source)	Immobilisation	Donneur d'acyle	Source de phospholipides	Solvant	Incorporation de l'AG (%)	Rendement (%)	Référence
PLA2 pancréatique	Oui	C8 :0	Lécithine de soja	Hexane	45,29	-	[156]
PLA1	Non	DHA	Non renseigné	Isooctane	20,9	9,8	[157]
PLA1	Oui	C18 :2 conjugué	Lécithine de soja	Sans solvant	19,06	2,25	[126]
PLA2 pancréatique	Non	C8 :0	Lécithine de soja	Hexane	87	-	[152]
				Diéthyl-éther	81		
				Méthanol	43,8		
PLA2 pancréatique	Oui	C18 :2 conjugué	Lécithine de soja	Hexane	4,2	-	[158]
PLA2	Oui	C8 :0 DHA C18 :2 conjugué	Lécithine de soja	Sans solvant	36	10,4	[154]
					30	6,6	
					20,2	4,2	
PLA1	Oui	FFA issus d'huile de poisson	Lécithine de soja	Sans solvant	57,4	9,5	[159]
PLA1	Oui	FFA issus d'huile de poisson	Lécithine de soja	Sans solvant	35	-	[160]
PLA1	Oui	Acide gras riche en ω 3 (huile de poisson)	Lécithine de soja	Sans solvant	49,7	-	[161]
PLA1	Oui	Ester éthylique de DHA et d'EPA	Lécithine de soja	Sans solvant	30,7	5,1	[162]
PLA2	Oui	C6:0	Lécithine de jaune d'œuf déacylé en sn-2	Toluène	27%	-	[153]

3.3.2 Modification par des lipases

La modification de phospholipides dans le but d'obtenir des phospholipides structurés par des lipases est étudiée depuis une trentaine d'années. De nombreuses publications relatent la modification de phospholipides dont la source peut être variable avec une prédominance d'études portant sur la lécithine de soja. L'obtention de phospholipides structurés par les lipases peut être réalisée par 3 types de réactions : l'estérification, l'hydrolyse et l'acidolyse. Lors des réactions d'estérification, la synthèse peut être réalisée en une ou en deux étapes. L'acidolyse permet l'obtention en une seule étape d'un phospholipide structuré dans la mesure où une des chaînes d'acide gras d'origine est conservée. L'hydrolyse quant à elle permet d'obtenir des lysophospholipides.

3.3.2.1 Hydrolyse

Une hydrolyse réalisée par les lipases permet l'obtention de lysophospholipides. La majorité des lipases étant régiosélectives pour la position sn-1 et sn-3, elles permettent l'obtention de lysophospholipides portant leur acyle en position sn-2. Cependant, le phénomène de migration des chaînes acylées peut conduire à l'obtention du 2-LPL, et ce malgré l'hydrolyse de l'acide gras porté par la position sn-1. Une réaction d'hydrolyse qui n'est pas arrêtée à temps peut donc conduire à l'obtention de GPC et d'acides gras libres sans lysophospholipides.

De la LPC DHA a été obtenue par hydrolyse de phospholipides naturellement riches en DHA issus de la micro-algue marine *Isochrysis galbana* [76]. Dans cette étude, un criblage de 12 lipases a été réalisé et a montré que les lipases RM-IM, issue de *Mucor miehei*, et TL-IM, issue de *Thermomyces lanuginosa*, sont spécifiques des acides gras à courtes chaînes permettant ainsi d'obtenir des LPC DHA. Dans une autre étude menée par Ono *et al.*, de la LPC DHA est obtenue par hydrolyse, catalysée par la lipase RM-IM, de PC issue de jaune d'oeuf de poules nourries avec de l'huile de poisson et de peau de calamars [163].

3.3.2.2 Estérification

Le plus souvent, les réactions d'estérification sont étudiées dans le but de synthétiser des lysophospholipides, les lysophospholipides étant un produit intermédiaire et les phospholipides un produit final de la réaction. Afin d'obtenir un phospholipide d'une grande pureté, l'estérification peut être réalisée lors d'un processus en deux étapes consistant en la synthèse d'un lysophospholipide en premier lieu. Le lysophospholipides synthétisé est alors

purifié et une nouvelle réaction d'estérification est réalisée avec pour substrat le lysophospholipide purifié et un nouvelle acide gras.

Lors de l'estérification de la GPC, un acide gras est estérifié sur une des deux fonctions alcool de la molécule de GPC. Kim et Kim [164] ont réalisé l'estérification d'acides gras de longueur de chaîne de 8 à 18 atomes de carbone sur la GPC en présence de différentes lipases. Dans cette étude, les auteurs démontrent l'intérêt de soumettre la réaction à un vide poussé, permettant de réduire l'activité de l'eau, pour améliorer le rendement de synthèse. En effet, ces réactions sont réalisées dans un milieu réactionnel pauvre en eau pour déplacer l'équilibre de la réaction vers l'estérification. Cependant, l'eau est un produit de la réaction et un excès d'eau dans le milieu peut conduire à une hydrolyse. Il en résulte alors une diminution du rendement global de synthèse.

Hong *et al.* [144] ont estérifié de l'acide linoléique conjugué avec de la GPC dans un système sous vide. Cinq enzymes ont été testées dont des phospholipases et des lipases immobilisées ou non. Les lipases non immobilisées se sont avérées moins efficaces pour la production de LPC que les lipases immobilisées. La lipase Novozym 435 issue de *Candida antarctica* a permis l'obtention d'un rendement de 40% après optimisation. La lipase RM-IM permet d'atteindre un rendement de 15% en LPC et de 2,5 % en PC. Cette étude démontre que l'application d'un vide de 1 mm Hg est optimale pour la synthèse de LPC. Toutefois pour la synthèse de PC, il est préférable de diminuer la pression à 0,5 mmHg. Cependant, lorsque la pression est de 0,5 mmHg, une diminution du rendement en LPC est observée. Un vide moins poussé (100 et 300 mmHg) diminue les rendements de synthèse et cela est dû au déplacement de l'équilibre de la réaction.

Lors de l'estérification de la LPC, un acide gras est estérifié sur la fonction alcool libre de la LPC. Cette réaction est donc réalisée dans le but d'obtenir des phospholipides. Adlercreutz *et al.*, [165] ont obtenu des rendements de 71% de caproyl-palmitoyl-PC avec la lipase *R. oryzae* en présence de toluène. Novozym 435 a permis d'atteindre un rendement en docosahexaénoyl-palmitoyl-PC de 45% à partir de 2-palmitoyl-LPC et la lipase issue de *Rhizopus arrhizus* a permis d'atteindre un rendement de 60%, en eicosapentaénoyl-palmitoyl-PC à partir de 2-palmitoyl-PC en présence de toluène.

Le Tableau 8 fait état des différentes publications sur l'obtention de phospholipides structurés par estérification catalysée par des lipases.

Tableau 8 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par estérification à l'aide de lipases

Enzyme (source)	Immobilisation	Donneur d'acyle	Substrat phosphorylé	Solvant	Rendement LPC (%)	Rendement PC (%)	Référence
<i>R. oryzae</i>	Oui	C6:0	Palmitoyl-LPC	Toluène	-	71	[165]
<i>R. oryzae</i>	Oui	C10:0	Hexanoyl-LPC	Toluène	-	60	[153]
RM-IM	Oui	Acide linoléique conjugué	GPC	Sans solvant	15	2,5	[144]
Novozym 435	Oui				40	1,2	
TL-IM	Oui				18	1,2	
Novozym 435	Oui	DHA	2-palmitoyl-LPC	Toluène	-	45	[166]
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Oui	EPA	2-palmitoyl-LPC		-	60	
RM-IM	Oui	C16:0	GPC	Sans solvant	88	12	[167]
RM-IM	Oui	C18:1	GPC	Sans solvant	75	~10	[133]
RM-IM	Oui	DHA	GPC	Sans solvant	30	-	[168]

3.3.2.3 Transestérification

Le Tableau 9 présente les publications parues durant les 15 dernières années et portant sur la transestérification des phospholipides par des lipases. Dans la majorité des cas, ces réactions sont catalysées dans un milieu solvaté.

La réaction d'acidolyse est étudiée le plus souvent avec des lipases immobilisées, les lipases TL-IM et RM-IM étant les plus souvent utilisées.

Les pourcentages d'incorporation du nouvel acide gras sont très variables selon l'acide gras étudié ainsi que la lipase considérée. Les acides gras incorporés sont le plus souvent des acides gras à chaîne moyenne (AGCM) tel que l'acide caprylique ou des acides gras à 18 carbones insaturés ou non. L'incorporation par acidolyse d'acide caprylique est également souvent étudiée. Des taux d'incorporation pouvant atteindre 46,3% ont été obtenus en l'absence de solvant en employant la lipase RM-IM [169].

Seules 3 études portent sur l'incorporation d'AGPI dans les phospholipides. Ces études sont menées en l'absence de solvant et en présence des lipases TL-IM ou la lipase de *Rhizomucor miehei* immobilisée ou non. Des phospholipides structurés riches en AGPI ont été obtenus avec des pourcentages d'incorporation en AGPI allant de 22% [161] à 39% [170]. Estiasih *et al.* [171] ont démontré que la réaction d'acidolyse se réalisait en deux temps, une première phase d'hydrolyse sélective puis en deuxième l'estérification de l'EPA. En effet, lors de la première étape, seul l'acide palmitique est hydrolysé permettant ainsi de concentrer les phospholipides structurés en acide linoléique. De plus, ce tableau met en évidence la faible variabilité des sources de phospholipides employées. En effet, les phospholipides natifs sont très peu diversifiés, la lécithine de soja et la lécithine de jaune d'œuf étant principalement représentées.

Une réaction de transestérification entre la GPC et des esters vinyliques d'acide gras a été réalisée par Virto et Adlercreutz [172]. Cette réaction a permis d'obtenir des lysophospholipides portant l'acyle en position sn-1 à des taux de conversion de 95% et sans formation de phosphatidylcholine dans les premières 24h. Cette étude montre qu'il est préférable de réaliser une transestérification plutôt qu'une réaction d'estérification pour obtenir le même produit. En effet, les taux de conversion sont deux fois plus élevés avec les esters vinyliques qu'avec les acides gras libres pour l'obtention de LPL. Cette méthode a été testée en présence et en l'absence de 50% (v/v) de t-butanol, la synthèse est plus importante lorsqu'elle est réalisée en présence de solvant.

Tableau 9 : Revue des publications portant sur l'obtention de phospholipides structurés par transestérification à l'aide de lipases

Enzyme (source)	Enzyme immobilisée	Donneur d'acyle	Source de phospholipides	Solvant	Type de réaction	Incorporation (%)	Référence
<i>Rhizomucor miehei</i>	Non	C20:5	Lécithine de soja		Acidolyse	22	[171]
TL-IM	Oui	C8:0	Lécithine de soja		Acidolyse	30	[173]
RM-IM						16	
TL-IM	Oui	C18:2	Lécithine de soja	Hexane	Acidolyse	15	[158]
Novozym 435						11,6	
<i>Mucor javanicus</i>	Non	C8:0	Lécithine de soja	Hexane Diéthyl-Ether Méthanol	Acidolyse	36,3 36,7 35,8	[152]
RM-IM	Oui	Acide lipoïque	PC C14:0	Toluène	Acidolyse	41,07	[174]
RM-IM	Oui	C20:5 ; C22:6	Lécithine de jaune d'œuf		Acidolyse	39	[170]
RM-IM						93,3	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Oui	Butanoate d'éthyle	PC C14 :0	Toluène	Interestérification	94,7	[175]
TL-IM						0	
RM-IM						28,7	
Novozym 435	Oui	Huile de tournesol (C18:1)	Jaune d'œuf	Hexane	Interestérification	43,9	[176]
TL-IM						28,8	
Novozym 435	Oui	C16:0	Lécithine de soja	Heptane	Acidolyse	57,1 61	[177]
TL-IM						46,3	
Novozym 435	Oui	C18:0				55,8	

Enzyme (source)	Immobilisation	Donneur d'acyle	Source de phospholipide	Solvant	Type de réaction	Incorporation (%)	Référence
TL-IM	Oui	C8:0	Lécithine de soja	Hexane	Acidolyse	30	[178]
RM-IM	Oui	C8:0	Lécithine de soja		Acidolyse	46,3	[169]
RM-IM	Oui	C18:2 (cis-9, trans-11)	Lécithine issu de jaune d'œuf	Heptane	Acidolyse	42	[179]
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Oui	Huile de graine de grenade (C18:2)	Lécithine de jaune d'œuf	Hexane	Interestérification	28	[180]
Novozym 435	Oui	C18:1 (huile de <i>Camelia oleifera</i>)	Lécithine de soja	Hexane	Interestérification	40,8	[181]
RM-IM	Oui	C8:0	Lécithine de soja	Hexane	Acidolyse	38,4	[156]
TL-IM	Oui	Acides gras riche en ω3 (Huile de poisson)	Lécithine de soja		Acidolyse	22,7	[161]
RM-IM Novozym 435						11,8 4,2	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Oui	C14:0	Lécithine de jaune d'œuf	Hexane	Acidolyse	44,2	[182]

En conclusion, différentes voies de synthèse peuvent être utilisées pour l'obtention de phospholipides structurés. Ces différentes réactions sont faciles à mettre en œuvre et sont le plus souvent réalisées dans un milieu solvaté, augmentant leur coût.

La synthèse par acidolyse à l'aide de lipases est la plus employée, l'incorporation dans les phospholipides de 50% du nouvel acide gras pouvant être atteinte. Cependant, lorsqu'il s'agit de l'obtention de phospholipides enrichis en AGPI, les études sont moins nombreuses. Pour l'estérification à l'aide de phospholipases, seulement 3 études sont connues. Par acidolyse à l'aide de phospholipases, seulement 4 études en font état. L'estérification par des lipases dans le but d'obtenir des phospholipides structurés riches en AGPI relate seulement une étude. Enfin, la recherche d'article sur l'acidolyse par les lipases dans le but d'obtenir des phospholipides enrichis en AGPI n'aboutit qu'à 3 études. Les AGPIs utilisés dans ces études sont issus d'huile de poisson. Aucune étude n'utilise d'AGPIs issus de microalgues, or les microalgues sont les producteurs primaires de ces AGPIs d'origine marine. Les sources de phospholipides sont également peu originales car le plus souvent, ce sont les phospholipides de soja ou de jaune d'œuf qui sont employés.

3.3.3 Migration des chaînes acylées

Lors de réactions de déacylation ou de transestérification dans le but d'obtenir des lysophospholipides ou des phospholipides structurés, il n'est pas rare d'observer la migration des acyles de la position sn-2 à la position sn-1 ou plus rarement de la position sn-1 à la position sn-2 (Figure 17). Il a été mis en évidence par Poisson *et al.* [136] qu'un abaissement de la température d'hydrolyse de phospholipides riche en DHA de 40°C à 30°C permet de réduire le taux de migration du DHA présent sur les phospholipides d'*Isochrysis galbana* de la position sn-2 à la position sn-1 de 40%.

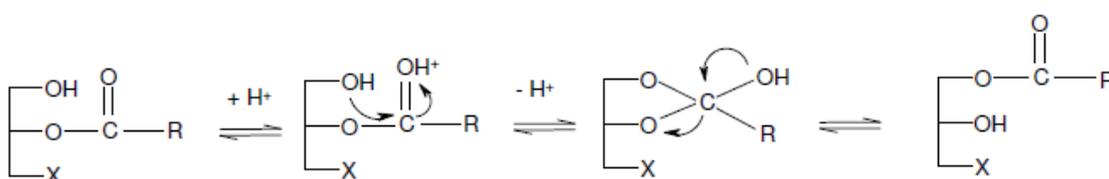


Figure 17 : Mécanisme proposé pour la migration de groupement acyles

Une autre étude a montré, lors de l'acidolyse de la tripalmitine par de l'acide caprylique, qu'une réduction de la température en cours de synthèse limite la migration des acyles dans des

systèmes sans solvant et avec solvant. Il a été mis en évidence que la migration est, de manière générale, plus importante dans le cadre de réactions conduites dans des milieux non solvatés. Lors de réactions dans un milieu fondu, la diminution de la température de réaction de 25°C après 8h de réaction a permis de réduire le taux de migration de 45% par rapport à une réaction menée à une température constante ; le rendement de synthèse, quant à lui, a diminué seulement de 5% [183].

Sugasini et Subbaiah [184] ont étudié l'impact de la nature de l'acyle sur la migration. En effet, le plus souvent, la migration des chaînes acylées est considérée en étudiant de la sn-2-palmitoyl-LPC. Or, les LPC d'origines naturelles portent en position sn-2 des acides gras insaturés. Ils ont donc observé que la migration est moins importante lorsque l'acyle est insaturé. Ainsi, ils ont mis en avant que les taux de migration étaient 5 fois moins importants pour la sn-2-DHA LPC que pour la sn-2-palmitoyl LPC. La nature de l'acide gras aurait également un effet sur la migration d'acyles.

4 Objectifs de la thèse

La première partie de la bibliographie met en évidence l'importance du DHA en santé. La forme sous laquelle le DHA est apporté à l'organisme change sa biodisponibilité. Ainsi, le DHA est mieux absorbé lorsqu'il est apporté sous forme de phospholipide. Il a également été vu que le DHA était principalement retrouvé au sein des microalgues marines qui en sont les productrices principales.

Le travail développé dans la suite de ce manuscrit porte sur la synthèse de phospholipides structurés riches en DHA. Le deuxième acide gras qui sera greffé sur ce phospholipide est l'acide caprylique connu pour ses propriétés anti-adipogènes et permettant de limiter l'oxydation des AGPI. L'objectif est donc de synthétiser par acidolyse, à partir des phospholipides de la microalgue *Tisochrysis lutea*, un phospholipide riche en DHA et en acide caprylique qui sera nommé dans la suite du travail PC DHA-C8. Les phospholipides microalgaux étant un substrat onéreux et dont la purification est fastidieuse, la réaction d'acidolyse a été dans un premier temps étudiée entre de la phosphatidylcholine de tournesol et de l'acide caprylique, permettant l'obtention de phosphatidylcholine enrichie en acide caprylique et en C18:2. Cette molécule sera nommée dans la suite du document PC C18:2-C8.

Cette synthèse est réalisée par des lipases. En effet, les lipases permettent d'abaisser l'apport d'énergie au milieu réactionnel en comparaison avec une synthèse chimique. Mais elles

permettent également une sélectivité de réaction. Les phospholipases n'ont pas été étudiées, elles présentent un coût plus élevé que les lipases.

La littérature mentionne peu d'études sur la synthèse de PC à partir de GPC. Les publications s'y intéressant présentent de très faibles rendements. Cette deuxième voie de synthèse sera néanmoins étudiée, l'objectif étant donc d'estérifier de l'acide caprylique et du DHA sur de la GPC en trouvant des conditions réactionnelles permettant d'améliorer les résultats déjà publiés.

II Matériels et méthodes

1 Matériels

1.1 Biocatalyseurs

Novozym 435 est une préparation enzymatique produite par Novozymes (Bagsvaerd, Danemark) et commercialisée par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Elle résulte de l'immobilisation de l'isoforme B de la lipase *Candida antarctica* sur une résine Immobead 150. Cette préparation se présente sous forme de granules blancs ayant un diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm. L'activité enzymatique est de 2000 U.g⁻¹ où une unité U est définie comme la quantité d'enzyme permettant la libération d'une μmol d'acide butyrique par minute à un pH de 7,5 et une température de 40°C lors de l'hydrolyse de la tributyrine.

Deux préparations de lipase de *Mucor miehei* différentes ont été utilisées. Ces deux préparations enzymatiques sont fabriquées par Novozymes (Bagsvaerd, Danemark).

- La lipase RM-IM est fournie par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) et a une activité de 275 IUN.g⁻¹ (Unité d'interestérification). Cette lipase est immobilisée sur une résine échangeuse d'anions et se présente sous forme de granules bruns dont le diamètre est compris entre 0,2 et 0,6 mm.
- La lipase Novozym 40086® est commercialisée par Strem Chemicals (Bischheim, France) et a une activité de 275 IUN.g⁻¹. Cette lipase est immobilisée sur une résine anionique macroporeuse qui se présente sous forme de granules blancs-beiges.

Deux préparations de lipase de *Pseudomonas cepacia* différentes ont été utilisées : la lipase PS-IM fabriquée par Novozymes et la lipase PS fabriquée par Amano, toutes deux distribuées par Sigma-Aldrich.

- La lipase PS-IM a une activité de 900 U.g⁻¹ et est immobilisée sur une résine Immobead 150. Elle se présente sous forme de granules blancs ayant un diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm.
- La lipase PS immobilisée sur terre de diatomées a une activité de 500 U.g⁻¹ et se présente sous forme de granules beiges.

Enfin, la lipase TL-IM issue de *Thermomyces lanuginosa* a été utilisée. Elle est produite par Novozymes et distribuée par Sigma-Aldrich. Elle se présente sous forme de granules blancs ayant un diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm. Elle a une activité de 250 IUN.g⁻¹.

1.2 Réactifs et solvants

Les réactifs utilisés dans ce travail expérimental ainsi que leurs fournisseurs sont listés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Réactifs et fournisseurs

Réactifs	Fournisseurs
Acide caprylique	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
Sésamol	
Acétate d'ammonium	
Acide myristique	
KCl	
NH ₄ H ₂ PO ₄	
NaOH	
Acide trifluoroacétique	
MgCl ₂	
K ₂ CO ₃	
NaCl	Biosolve (Dieuze, France)
Acide linoléique	Accros Organic (Villebon-sur-Yvette, France)
Glycérophosphatidylcholine	Bachem (Bubendorf, Suisse)
Phosphatidylcholine de tournesol	Lipoid (Ludwigshafen, Suisse)
Acide docosahexaénoïque	Larodan (Solna, Suède)
Acétate de cuivre	Merck (Fontenay-sous-Bois, France)
Silice	
Acide acétique	Carlo Erba (Val-de-Reuil, France)
Acide orthophosphorique	Panreac (Coger, Paris, France)

Les solvants utilisés dans ce travail expérimental ainsi que leurs fournisseurs sont listés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Solvants et fournisseurs

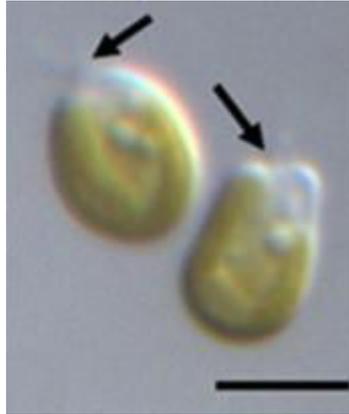
Solvants	Fournisseurs
Méthanol HPLC Grade	Fisher Scientific (Illkirch, France)
Acétonitrile HPLC Grade	
Méthanol optima LC/MS grade	
Méthanol	
Chloroforme	
Isopropanol	
Acétate de méthyle	VWR (Fontenay-sous-Bois, France)
Dichlorométhane	
Diéthyléther	
Acétone	
Ether de pétrole	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
Trifluorure de Bore (BF ₃)	

1.3 Microalgue utilisée

La souche axénique d'*Isochrysis affinis galbana* CCAP 927/14 (Haines) a été récemment renommée *Tisochrysis lutea* par Bendif *et al.* [185]. Cette souche est originaire de Tahiti et intègre la classification des microalgues comme suit :

- Division : Haptophytes
- Classe : Prymnesiophyceae
- Ordre : Isochrysidales
- Famille : Isochrysidaceae
- Genre : *Tisochrysis*
- Espèce : *lutea*

Tisochrysis lutea est une microalgue flagellée, non calcifiée de forme ovoïde ayant un diamètre compris entre 4 et 6 µm (Photographie 1). Elle présente deux flagelles apicaux qui lui permettent de se déplacer grâce à des mouvements hélicoïdaux. Cette microalgue est largement utilisée en aquaculture comme source d'alimentation pour les coquillages et crevettes.



Photographie 1 : Micrographie optique de deux cellules mobiles de *Tisochrysis lutea*. Les flèches désignent la dépression apicale au niveau des flagelles. La barre d'échelle représente 5 μm [185]

La production de la biomasse est réalisée à grande échelle par la société GREENSEA (Mèze, France). *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) est cultivée en bioréacteurs de 100 L dans une eau de mer où la salinité a été ajustée à 28 g.L^{-1} . L'éclairage est assuré en continu par des tubes néons à 100 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La température est fixée à 20°C et l'agitation est assurée par bullage en injectant de l'air et du CO₂. Les microalgues sont récoltées par décantation en début de phase stationnaire. Afin de limiter l'action des enzymes lipolytiques endogènes, la biomasse est alors montée en température par bain-marie dans une eau à 90°C pendant 10 min. La biomasse est finalement centrifugée à une vitesse de rotation de 10 000 tours/min à 4°C jusqu'à l'obtention d'un culot. La biomasse (3L) partiellement déshydratée est alors conservée à -20°C.

2 Plan d'expériences

De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherchera à déterminer et à établir les liens existants entre 2 types de variables :

- La réponse : grandeur physique étudiée
- Les facteurs : grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, censées influencer sur la réponse.

La méthode vise aussi bien à comprendre les relations liant la réponse avec les facteurs, que les facteurs entre eux. Ainsi, c'est un outil indiqué lorsque plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer une réponse. Les plans d'expériences permettent d'obtenir un maximum de renseignements avec un minimum d'expériences afin de déterminer les conditions optimales du système étudié.

En effet, l'intérêt de la méthode des plans d'expériences vis-à-vis des méthodes classiques ou pas à pas est de réduire le nombre d'essais, de prendre en compte les interactions entre les différents facteurs, d'identifier les facteurs ayant une influence et de quantifier les effets des facteurs sur la réponse.

L'étude d'un phénomène revient souvent à s'intéresser à une grandeur particulière. Sous une forme mathématique, la grandeur d'intérêt (Y) aussi nommée la réponse est une fonction de plusieurs variables (x_i). Dans le cadre d'un plan d'expériences, ces variables sont nommées les facteurs. L'équation suivante est alors obtenue :

$$Y=f(x_1,x_2,x_3, \dots,x_k)$$

Chaque facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 18). Lorsqu'un facteur est étudié, ses variations sont limitées entre un niveau bas, noté -1, et un niveau haut, noté +1. Les valeurs du facteur sont en effet centrées réduites. L'ensemble des points compris entre ces deux niveaux forme le domaine du facteur.

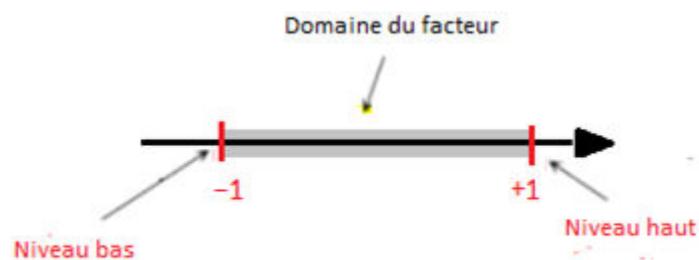


Figure 18 : Représentation graphique du domaine expérimental pour un facteur. Le niveau bas du facteur est noté -1 et le niveau haut est noté +1. Le domaine de variation est représenté en gris.

Le domaine expérimental est formé par l'intersection des domaines de chaque facteur.

Une expérience donnée peut être représentée par un point dans ce système d'axes. Une expérience est alors désignée par l'expression « point expérimental » ou « point d'expérience ». Un plan d'expériences est donc représenté par un ensemble de points expérimentaux, eux-mêmes situés dans le domaine expérimental (Figure 19).

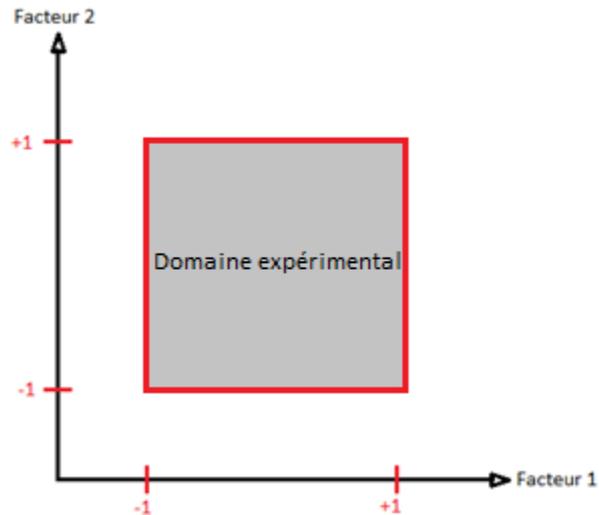


Figure 19 : Représentation graphique du domaine expérimental pour 2 facteurs

Il est possible de dessiner le domaine expérimental jusqu'à 3 facteurs (Figure 20). Au-delà de trois facteurs, une représentation en tableau, dite matricielle, est utilisée.

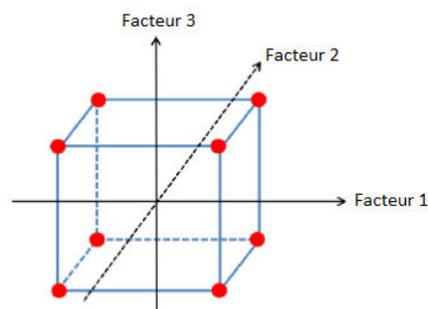


Figure 20 : Représentation graphique du domaine expérimental pour 3 facteurs

Il existe une vaste gamme de plans d'expériences disponibles qui s'adaptent selon les phénomènes étudiés. Dans un premier temps, il faut définir les facteurs qui vont être étudiés et les niveaux -1 et +1 de chacun d'entre eux, définissant ainsi les bornes du domaine. Il faut ensuite déterminer avec quel plan d'expériences l'étude va être réalisée. Le choix du plan d'expériences est fait afin de faciliter l'interprétation des résultats. Il doit minimiser le nombre d'essais sans toutefois sacrifier la qualité. Vient ensuite la phase d'expérimentation où les manipulations retenues sont réalisées. Enfin, la modélisation est obtenue en utilisant un logiciel, dans ce travail le logiciel Modde (SigmaPlus, Labège, France) est utilisé.

3 Traitement et analyses des lipides

3.1 Extraction des lipides microalgaux

Quatre mélanges de solvant d'extraction des lipides totaux ont été testés dans ce travail avec l'application d'ultrasons à l'aide de deux appareillages différents dans le but d'optimiser cette extraction.

3.1.1 Choix du mélange de solvant pour l'extraction

La première méthode issue de la publication de Hara et Radin [186] utilise un mélange de 20 mL d'isopronanol et 30 mL d'hexane. La seconde méthode dérivée du travail de Folch *et al.* [187] emploie 20 mL de méthanol et 40 mL de chloroforme comme mélange de solvant. La 3^{ème} méthode issue de travaux de Chen *et al.* [188] a pour mélange de solvant 25 mL de méthanol et 50 mL de dichlorométhane. Enfin la dernière méthode de Bligh et Dyer [189] utilise 25 mL de méthanol, 12,5 mL de chloroforme et 5 mL d'eau osmosée.

Dix grammes de culot de microalgues sont incorporés dans les différents mélanges de solvant puis placés soit dans un bain à ultrasons pour une durée de 20 min, soit dans un bécher avec la sonde de sonication pour une durée de 20 min avec un cycle de 0,5 W.s⁻¹ et une amplitude de 50%.

3.1.2 Optimisation de la méthode d'extraction aux ultrasons

Le sonicateur génère une onde qui est transmise dans le milieu comme vague de pression. Des microbulles de cavitation sont formées et produisent d'importants effets physiques (forces de cisaillement, ondes de chocs), favorisant le bris cellulaire. Les ultrasons sont plus couramment utilisés en association avec les techniques d'extraction au solvant ou enzymatique pour en augmenter l'efficacité. Cependant, cette technique présente quelques inconvénients liés à l'augmentation de la température et au bruit.

Les paramètres optimaux de la sonde de sonication (UP50H, Hielscher, Allemagne) ont été déterminés à l'aide d'un plan d'expériences. La réponse étudiée est la quantité des phospholipides extraits.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction et ont été étudiés dans le plan d'expériences considéré :

- La durée de sonication
- Le cycle de sonication
- L'amplitude d'oscillation.

Tous ces facteurs peuvent être modifiés et la variation successive et systématique de tous les paramètres conduirait à réaliser des centaines d'expériences. Le plan d'expériences limite ce nombre et contrairement à une méthode classique, d'un facteur à la fois, il permet d'étudier la dépendance des facteurs les uns vis-à-vis des autres.

Afin d'étudier les différents facteurs cités ci-dessus, la biomasse microalgale est décongelée puis centrifugée à 5000 tours.min⁻¹ pendant 10 minutes. Un gramme de biomasse est mis en suspension dans 22 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1). Cette suspension est placée sous agitation et soumise aux ultrasons à l'aide d'un sonicateur. Les facteurs vont alors prendre les valeurs des niveaux -1, 0 et +1 successivement.

Tableau 12 : Paramètres du plan d'expériences portant sur l'extraction des phospholipides microalgaux

Paramètres	Niveaux				
	- α	-1	0	+1	+ α
Durée de sonication (min)	11,59	15	20	25	28,41
Amplitude (%)	20	32	50	68	80
Cycle (W/s)	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8

Le plan d'expériences mis en place est un plan composite centré. Il est composé de 15 expériences dont un point au centre du domaine expérimental (répété 6 fois) et 6 points étoiles (Figure 21).

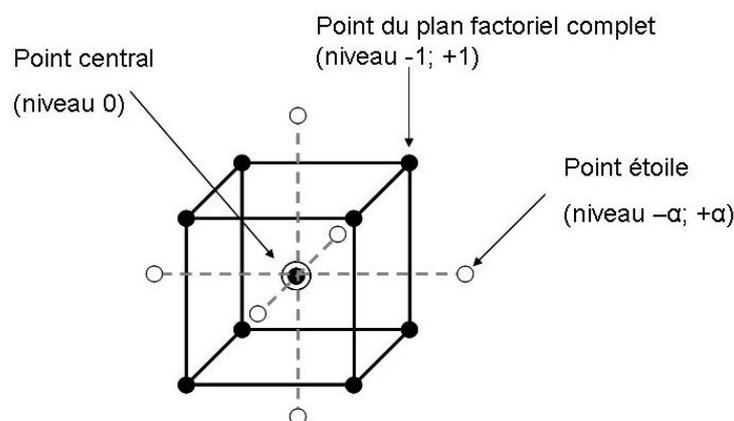


Figure 21 : Représentation schématique d'un plan composite centré

Suite à l'optimisation réalisée à l'aide du plan d'expériences, les réglages des paramètres de la sonde sont :

- Amplitude : 35%
- Durée : 15 min
- Cycle : 0,3 W.s⁻¹.

Afin d'obtenir une séparation optimale des deux phases chloroformiques et méthanoliques, 5 mL d'une solution saline (NaCl saturé) sont ajoutés et le mélange est placé dans une ampoule à décanter. Après décantation, la phase chloroformique est recueillie dans un ballon et évaporée au rotavapor (Heidolph 94200, Schwabach, Allemagne) à une pression de 200 mmHg et une température de 45°C.

3.2 Dosage colorimétrique des phospholipides

3.2.1 Méthode au molybdate d'ammonium

Les phospholipides totaux peuvent être quantifiés par dosage du phosphore. Après digestion à l'aide d'un acide chaud, le phosphore inorganique va réagir avec du molybdate d'ammonium donnant ainsi un complexe bleu.

Une solution de molybdate d'ammonium est obtenue en solubilisant 250 mg de molybdate d'ammonium dans 10 mL d'eau osmosée.

Dix microlitres d'échantillon d'extraction de lipides microalgaux totaux sont évaporés sous flux d'azote puis 0,65 mL d'acide perchlorique est ajouté. L'échantillon acidifié est alors placé dans un bain de sable à 180°C pendant 1 h. L'extrait acidifié est alors dilué dans 3,3 mL d'eau osmosée puis 0,5 mL de solution de molybdate d'ammonium et 0,5 mL d'une solution d'acide ascorbique à 10% sont ajoutés. Le tube contenant l'extrait est ensuite maintenu pendant 5 min dans un bain marie à 100°C. Une lecture de l'absorbance est ensuite réalisée à une longueur d'onde de 800 nm [190].

Une gamme d'étalonnage a été réalisée avec des phospholipides de tournesol. La droite d'étalonnage montrait une bonne corrélation.

3.2.2 Méthode au ferrothiocyanate d'ammonium

La méthode de Stewart [191] utilisée pour le dosage des phospholipides dans les lipides totaux après extraction est basée sur la formation d'un complexe entre les phospholipides et le ferrothiocyanate d'ammonium.

Une solution de ferrothiocyanate d'ammonium est obtenue en solubilisant 16,5 g de chlorure ferrique anhydre et 30 g de thiocyanate d'ammonium dans 1 L d'eau.

Dix microlitres de la solution de lipides microalgaux totaux obtenus après extraction sont évaporés sous flux d'azote puis repris dans 2 mL de chloroforme. Un mL de la solution de ferrothiocyanate d'ammonium est ajouté et le mélange est agité au vortex. Deux phases sont observées, la phase chloroformique est récupérée et l'absorbance est mesurée à 488 nm.

La gamme d'étalonnage de phosphatidylcholine de tournesol montre une bonne corrélation pour des quantités de PC de 0 à 100 μg (Figure 22).

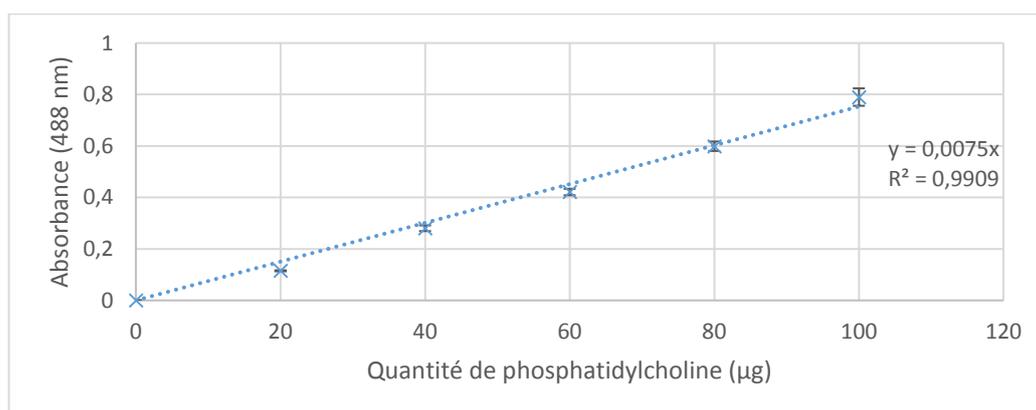


Figure 22 : Gamme d'étalonnage de la PC de tournesol par la méthode au ferrothiocyanate d'ammonium

3.3 Séparation des classes de lipides

Afin de récupérer la fraction phospholipidique qui servira à la mise en œuvre de la réaction d'acidolyse, l'extrait lipidique est fractionné en lipides neutres, glycolipides et phospholipides à l'aide d'une colonne à gel de silice. La masse de silice utilisée est fonction de la masse de l'échantillon (20 g de silice pour 1 g d'extrait lipidique). La silice est conditionnée dans le solvant permettant d'éluer les lipides neutres, le dichlorométhane.

Les lipides neutres sont élués par du dichlorométhane, les glycolipides sont élués par de l'acétone et les phospholipides sont élués par du méthanol. Chaque fraction est évaporée au rotavapor et pesée. Le changement d'éluant est réalisé lorsque la masse des fractions recueillies

pour un éluant est nulle. La pureté de chacune des fractions est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM). Toutes les fractions obtenues sont concentrées à sec, pesées et conservées à -20°C dans du dichlorométhane et/ou du méthanol selon les fractions.

3.4 Analyses par chromatographie sur couche mince

Les plaques CCM utilisées sont des feuilles d'aluminium recouvertes d'un gel de silice 60 (Merck Millipore, Molsheim, France).

Un dépôt de $5\ \mu\text{L}$ par échantillon est réalisé à l'aide d'un déposateur automatique d'échantillons, le Linomat V (Camag, Muttenz, Suisse).

3.4.1 Réactions d'estérification

La faisabilité des réactions d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA (Figure 23) est démontrée par CCM sur feuille d'aluminium de dimensions $10 \times 20\ \text{cm}$.

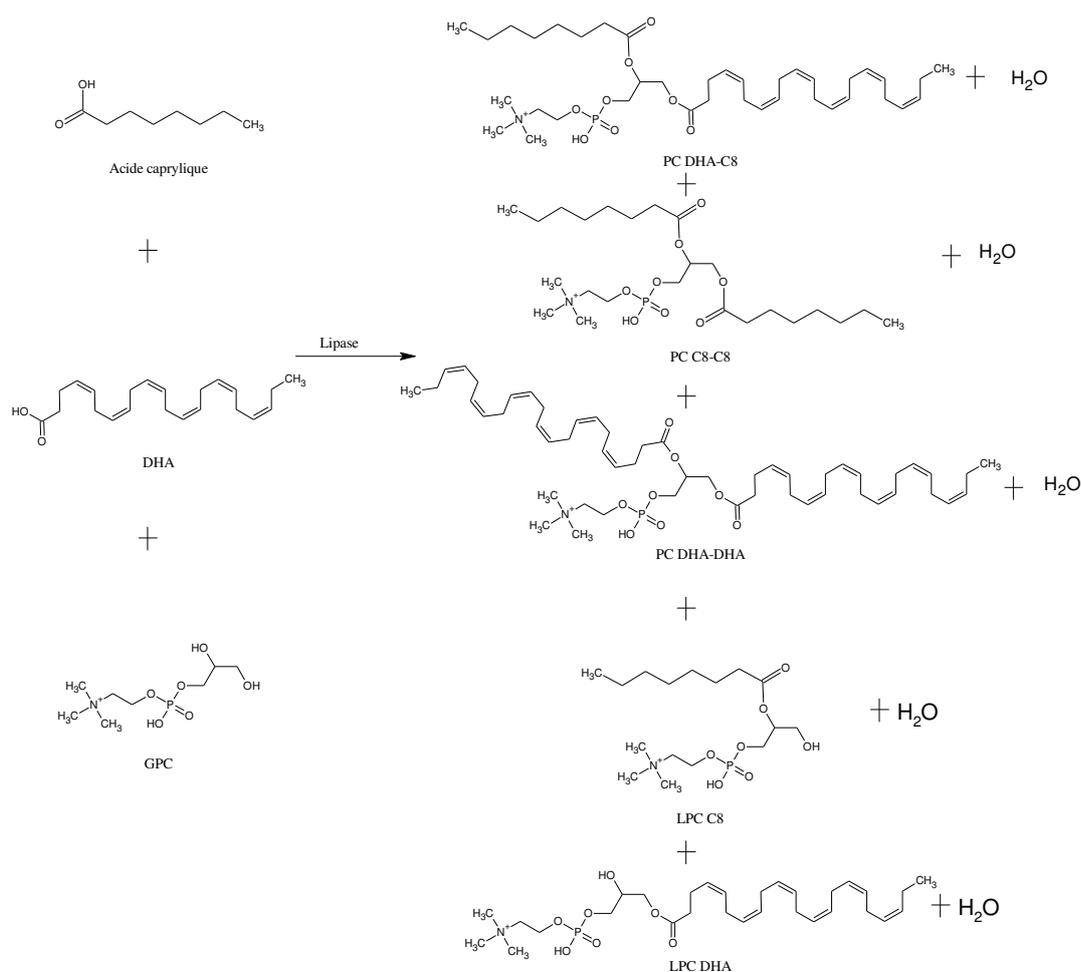


Figure 23 : Réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA

Le développement est réalisé dans le mélange de solvants suivant : dichlorométhane/méthanol/eau (65:30:3, v/v/v) [192]. Après migration, la plaque est séchée à température ambiante pendant 5 à 10 min. A la révélation (3.4.3), les molécules visibles seront les lysophospholipides, les phospholipides produits et acides gras libres restants. La glycérophosphocholine (GPC) n'est, quant à elle, pas révélée.

3.4.2 Analyse des fractions lipidiques microalgales

Les extraits et fractions lipidiques microalgales sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaques de dimensions 20 x 20 cm. La séparation a lieu grâce à un double développement en une dimension.

Le premier développement permet la séparation des différents lipides polaires alors que les lipides neutres migrent au front de solvant. Il est réalisé sur la moitié de la hauteur de la plaque dans le solvant de migration suivant : acétate de méthyle/propan-2-ol/chloroforme/méthanol/solution aqueuse de KCl 0,25% (25:25:25:10:9 – v/v/v/v/v).

La plaque est ensuite séchée à température ambiante pendant 10 min avant le second développement qui permet la séparation des lipides neutres. Le système de solvant utilisé est un mélange éther de pétrole/diéthyl éther/acide acétique glacial (85:15:2 – v/v/v) sur toute la hauteur de la plaque.

3.4.3 Révélation

La technique de révélation utilisée est la même pour toutes les CCM réalisées dans cette thèse. La révélation est réalisée par vaporisation d'une solution d'acétate de cuivre à 5% (m/v) préparée dans de l'acide phosphorique à 12,75% (v/v) suivie d'une incubation de la plaque pendant 5 min à 180°C.

L'identification des composés se fait par comparaison des rapports frontaux avec ceux de solutions standards chromatographiées dans les mêmes conditions.

3.5 Analyses par chromatographie liquide haute performance

Les solvants utilisés pour les analyses en Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sont de qualité HPLC et sont préalablement filtrés sur membrane de nylon de 0,45 µm.

Une chaîne HPLC modèle 1260 Infinity d'Agilent Technologies (Les Ulis, France) équipée d'un dégazeur de solvant en ligne, d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique, d'un détecteur UV-visible couplé à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) de Polymer Laboratories-Varian (modèle PL-ELS 2100) a été utilisée pour les analyses chromatographiques. Le logiciel permettant le pilotage et le traitement des données est Chemstation 32 (Agilent Technologies).

L'utilisation en série de deux modes de détection permet d'identifier l'ensemble des composés présents dans les milieux en une seule analyse. Dans le cadre de cette thèse, le détecteur UV est réglé à une longueur d'onde de 205 nm ce qui permet la détection de molécules comprenant une ou plusieurs doubles liaisons.

Pour l'ensemble des expériences, le réglage des 3 paramètres du DEDL est fixé à :

- Débit d'azote : 1,1 SLM (Standard Liter per Minute)
- Température de nébulisation: 35°C
- Température d'évaporation: 35°C.

3.5.1 Préparation des échantillons

Le suivi des réactions est réalisé par l'analyse de prélèvements effectués au cours des réactions étudiées. La viscosité du milieu réactionnel ne permet pas le prélèvement d'un volume d'échantillon précis, chaque prélèvement sera donc pesé. Pour réaliser la dilution nécessaire à l'analyse, le volume de diluant (méthanol) est estimé en fonction de la masse pesée selon la formule suivante:

$$V_{MeOH}(\mu L) = \frac{\text{masse du prélèvement (mg)}}{\rho (\text{acide gras en excès}) (\text{mg}/\mu L)} \times (\text{facteur de dilution} - 1)$$

Exemple : dans le cadre de la dilution au tiers d'un prélèvement de la réaction d'acidolyse avec de l'acide caprylique, le calcul effectué sera :

$$V_{MeOH}(\mu L) = \frac{y}{0,91} \times 2$$

avec y, masse du prélèvement

Les échantillons sont analysés directement ou stockés à -18°C.

Afin de ne pas obstruer la colonne avec les résidus de support enzymatique, l'ensemble des échantillons est centrifugé à 10 000 tours.min⁻¹ pendant 10 min avant analyse HPLC.

3.5.2 Suivi de la réaction d'acidolyse

Une méthode permettant le suivi de la réaction d'acidolyse par quantification des acides gras libérés et produits néosynthétisés a été développée dans le cadre de ce travail. La validation de la méthode analytique a également été réalisée. Cette partie du travail a donné lieu à la publication d'un article [193] (cf Annexe I).

3.5.2.1 Gradient d'élution

La colonne utilisée est une colonne en phase inverse Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies) (4,6 x 50 mm, 2,7 µm). Le débit de la phase mobile est de 1 mL.min⁻¹ et le volume de chaque injection est de 5 µL. La phase mobile est composée d'eau acidifiée (0,05% d'acide trifluoroacétique (TFA)) et de méthanol acidifié (0,05% de TFA). L'élution est réalisée par le gradient présenté dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Gradient d'élution pour l'analyse de la réaction d'acidolyse

Temps (min)	Eau + TFA (0,05%) (%)	Méthanol + TFA (0,05%) (%)
0	13	87
3,5	13	87
7,5	2	98
9,6	2	98
10,6	0	100
14	0	100
15	13	87

3.5.2.2 Validation de méthode

La validation de méthode a été réalisée conformément aux lignes directrices de l'ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). Dans ce cadre, la fiabilité de la méthode HPLC a été établie par sa spécificité, son étalonnage, sa limite de détection (LOD), sa limite de quantification (LOQ), la justesse, sa précision, sa robustesse et l'effet mémoire.

- La spécificité

La PC de tournesol qui ne contient pas d'acides gras libres a été choisie comme matrice lipidique pour étudier la spécificité. Un mélange de 10 acides gras standards (2 mM) a été analysé en l'absence et en présence de phosphatidylcholine de tournesol (20 mM). Ceci permet de s'assurer que les acides gras libres n'interfèrent pas avec la phosphatidylcholine de tournesol lors de l'analyse. Les résultats ont été analysés en considérant pour chaque acide gras leur aire sous le pic et leur temps de rétention.

- Etalonnage

Des solutions mères des 10 acides gras considérés ont été préparées séparément dans une solution de méthanol + TFA (0,05%) à une concentration de 100 mM. Pour tracer les courbes d'étalonnage, un mélange de 10 acides gras (10 mM de chaque acide gras libre) a été préparé en mélangeant 200 µL de chaque solution mère d'acides gras libres. Les courbes d'étalonnage ont été établies en fonction de l'aire sous le pic pour chaque concentration d'acide gras libre injecté (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 mM).

- Limites de détection et limites de quantification

Pour chaque acide gras, les valeurs de LOD et LOQ ont été déterminées en utilisant le logiciel Agilent Chemstation. Ils correspondent aux concentrations les plus faibles donnant lieu à un rapport signal/bruit particulier. Un rapport signal/bruit compris entre 3/1 et 2/1 est généralement considéré comme acceptable pour une LOD. Pour la LOQ, un rapport signal/bruit doit être égal à 10/1.

- La justesse

La précision d'une méthode analytique est exprimée en comparant la valeur attendue à la valeur trouvée. Elle est calculée en considérant le pourcentage de recouvrement (%R). Dans le cas présent, six analyses successives d'une solution standard d'acides gras libres à 2 mM enrichie en lécithine de tournesol ont été réalisées. Les résultats ont été déterminés à l'aide de la formule suivante :

$$\% R = (\text{concentration mesurée} / \text{concentration attendue}) \times 100$$

- La précision

La précision a été évaluée en termes de répétabilité et de reproductibilité. La répétabilité a été évaluée après l'analyse de 6 injections consécutives du même mélange standard tandis que la

reproductibilité a été évaluée après l'analyse de 6 injections de 6 solutions standard préparées de la même manière.

- La robustesse

Trois paramètres analytiques (le pourcentage d'eau dans la phase mobile, le débit de solvant ainsi que la température de la colonne) ont été modifiés séparément afin d'évaluer la robustesse de la méthode. Tous les essais ont été réalisés en triplicat et les résultats sont exprimés en % de recouvrement.

- L'effet mémoire

L'effet mémoire a été évalué en analysant le chromatogramme d'un blanc consécutif à l'injection d'un échantillon contenant le double des quantités d'acides gras trouvées comme étant les valeurs hautes de la gamme d'étalonnage.

3.5.3 Suivi de la réaction d'estérification

Une méthode HPLC permettant la détection d'une partie des produits de la réaction d'estérification (PC DHA-DHA, PC DHA-C8 et LPC DHA) a été développée pour ce travail. L'élution des composés a été optimisée.

La colonne utilisée est une colonne Kinetex HILIC (Phenomenex, Sartrouville, France) (4,6 x 50 mm, 2,7 μ m). Le débit de la phase mobile est de 1 mL.min⁻¹ et le volume de chaque injection est de 3 μ L. La phase mobile est composée d'acétonitrile, d'une solution d'acétate d'ammonium (10 mM) et de méthanol. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient présenté dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Gradient d'élution pour l'analyse de la réaction d'estérification

Temps (min)	Méthanol (%)	Acétate d'ammonium (10 mM) (%)	Acétonitrile (%)
0	10	0	90
5	10	0	90
5,5	35	10	55
10	35	10	55
11	10	0	90
12	10	0	90

Cette méthode permet la quantification de trois composés : la PC DHA-DHA, la PC DHA-C8 et la LPC DHA. Un chromatogramme est présenté sur la Figure 24.

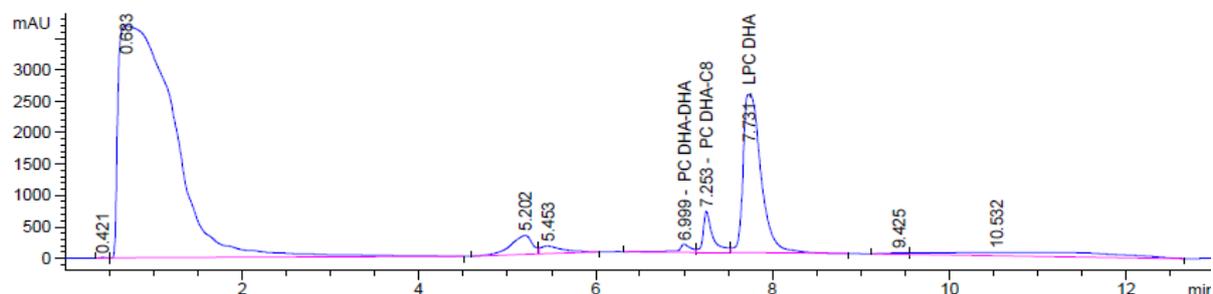


Figure 24 : Chromatogramme obtenu par HPLC couplée à un détecteur UV (205 nm) d'un échantillon d'estérification entre la GPC, le DHA et l'acide caprylique

3.5.4 UHPLC-MS des produits de l'estérification

Pour s'assurer de la nature des produits synthétisés au cours de la réaction d'estérification, il est nécessaire de déterminer la masse des composés synthétisés. Ainsi, une analyse par chromatographie liquide liée à un spectromètre de masse a été réalisée. Les composés ont donc été dans un premier temps purifiés puis analysés par UHPLC-MS.

3.5.4.1 Purification des phospholipides structurés

Afin de réaliser des analyses UHPLC-MS, les produits de la réaction d'estérification sont déposés sur une cartouche de gel de silice (Sep Pak 20cc (5g), Waters). Le volume de mélange réactionnel déposé est de 300 μ L. L'éluion est réalisée avec les éluants présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Gradient de solvants utilisés pour la séparation des produits de synthèse

Solvant	Volume (mL)
Dichlorométhane	35
Dichlorométhane/Méthanol (90:10)	30
Dichlorométhane/Méthanol (80:20)	15
Dichlorométhane/Méthanol (70:30)	15
Dichlorométhane/Méthanol (60:40)	15
Méthanol	20
Méthanol/Eau (90:10)	10
Méthanol/Eau (50:50)	30

Les fractions recueillies ont un volume de 5 mL et sont évaporées sous un flux d'azote. Elles sont ensuite reprises dans un volume de 250 µL de méthanol et analysées par HPLC selon la méthode décrite dans le paragraphe 3.5.3 de la partie Matériels et Méthodes.

3.5.4.2 Caractérisation des phospholipides obtenus par estérification

Les solvants utilisés pour l'analyse UHPLC-MS sont de qualité optima UHPLC-MS et sont préalablement filtrés sur membrane de nylon de 0,45 µm.

Les produits sont identifiés par spectrométrie de masse. Les analyses sont effectuées sur une chaîne UHPLC U3000 (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) constituée d'un passeur d'échantillons et d'une pompe quaternaire. Cinq µL d'échantillon sont injectés et séparés sur une colonne Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 50 mm, 2,7 µm) maintenue à une température de 25°C. L'élution est réalisée à un débit de 1 mL.min⁻¹ selon le gradient présenté dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Gradient d'élution pour l'analyse UHPLC-MS

Temps (min)	Méthanol + Acide formique (0,05%) (%)	Eau + Acide formique (0,05%) (%)
0	80	20
6	90	10
11	90	10
19	100	0
23	100	0
24	80	20
25	80	20

La chaîne UHPLC est couplée à un spectromètre de masse MicrOTOF-Q IIII (Bruker, Wissembourg, France) équipé d'une source électrospray (ESI) en mode positif. Le gaz de nébulisation, dont la pression est fixée à 5 bars, est l'azote. Il est utilisé comme gaz séchant et sa température est fixée à 200°C. L'acquisition est effectuée en mode positif dans une gamme de masse comprise entre m/z 50 et 1000.

3.6 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras issus des fractions lipidiques de *Tisochrysis lutea*

3.6.1 Préparation des échantillons

Le solvant de la fraction lipidique microalgale (partie II paragraphe 3.1) étudiée est évaporé sous flux d'azote. Le résidu lipidique est repris dans 1 mL de soude méthanolique à 0,5 M dans un tube à méthyler. La saponification des lipides est réalisée dans un incubateur à 80°C pendant 15 min.

Les acides gras saponifiés sont repris dans 2 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore (BF₃ à 14%). Les acides gras sont méthylés pendant 15 min à 80°C [194]. Les esters méthyliques sont ensuite extraits 2 fois à l'aide de 2 mL d'isooctane. La phase supérieure, l'isooctane, contenant les esters méthyliques, est récupérée puis rincée à 4 reprises par de l'eau osmosée afin d'éliminer les traces de BF₃. L'extrait est ensuite séché sur du sulfate de sodium anhydre, l'échantillon est prêt pour être analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

3.6.2 CPG des esters méthyliques des fractions lipidiques de *Tisochrysis lutea*

Les analyses sont réalisées sur un chromatographe Focus GC (Thermo Electron Corporation, Les Ulis, France) muni d'un injecteur split/splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire CP Sil 88 de 25 m x 0,25 mm, 0,2 µm (Varian, Les Ulis, France). Les injections sont réalisées à l'aide d'un injecteur automatique AI 3000 (Thermo Electron Corporation).

Le gaz vecteur utilisé est de l'azote à un débit de 1 mL.min⁻¹. La température du détecteur à ionisation de flamme est fixée à 280°C. Après injection, la colonne est soumise à un gradient de température comme décrit ci-après : 4 min à 120°C, puis augmentation de la température de 120°C à 220°C à raison de 6°C.min⁻¹. La température finale est maintenue à 220°C pendant 5 min. Le ratio du split est fixé à 15 soit un débit de fuite de 15 mL.min⁻¹. Les esters méthyliques d'acides gras sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards.

4 Réactions enzymatiques

4.1 Mesure de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) reflète la disponibilité de l'eau dans le système. Les mesures sont réalisées dans une chambre de mesure d'un analyseur d'activité de l'eau, AqualabLite (Decagon Devices Inc., USA). L'appareil est préalablement équilibré à température ambiante à l'aide de solutions salines saturées standards. Les mesures sont réalisées sur la préparation enzymatique avant son introduction dans le milieu réactionnel et sur 1 g de milieu réactionnel, au début de la réaction.

4.2 Détermination de la vitesse initiale

L'évolution de l'absorbance permet de suivre la vitesse de formation du produit car l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration. En début de réaction enzymatique, les premiers points sont alignés et forment une droite. Cette droite permet de calculer la vitesse initiale de la réaction. Dans le cadre de cette étude, les points pour les réactions le plus rapides sont alignés entre 0 et 3 heures de réaction. Cette droite est réalisée à l'aide du logiciel Excel permettant ainsi de déterminer le coefficient de corrélation ainsi que la vitesse initiale correspondant au coefficient directeur de la droite.

4.3 Réaction d'acidolyse entre la phosphatidylcholine de tournesol et l'acide caprylique

La réaction d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique a été utilisée comme modèle d'étude. Afin de suivre cette réaction, la phosphatidylcholine majoritairement synthétisée, la PC C18:2-C8, est quantifiée. Selon les paramètres de la réaction, une hydrolyse peut être observée, ainsi, il peut être nécessaire de quantifier la formation de LPC C18:2 au cours des réactions (Figure 26).

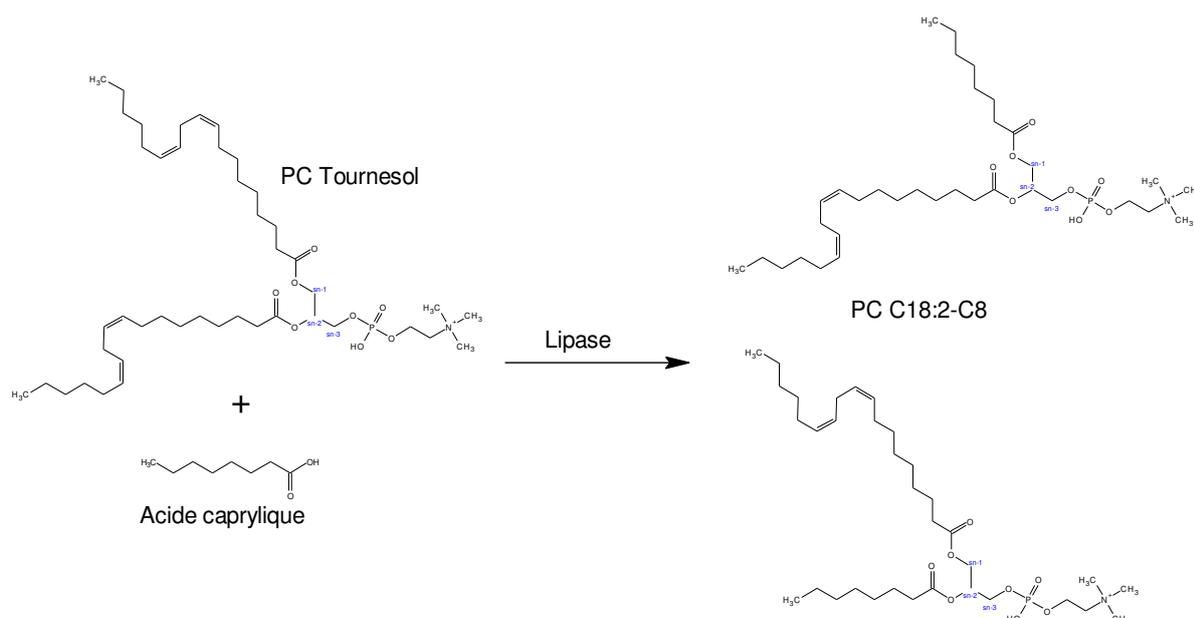


Figure 25 : Réaction d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique (cette réaction ne présente que les produits souhaités de la réaction. Il peut y avoir formation également de LPC C18:2, LPC C8, GPC et les acides gras libérés C8:0 et C18:2)

4.3.1 Criblage enzymatique

La mise en place de la réaction enzymatique est précédée d'un criblage avec les six préparations enzymatiques citées dans le paragraphe 1.1 de cette partie afin de déterminer l'enzyme la plus appropriée pour effectuer l'acidolyse de la phosphatidylcholine de tournesol par l'acide caprylique.

Cette réaction a été réalisée dans un agitateur thermostaté (Thermomixer Eppendorf[®], Montesson, France) dans des tubes fermés de 15 mL. La température de réaction a été fixée à 45°C, le ratio molaire à 6 (acide caprylique/PC), le temps de réaction à 54 h et la vitesse d'agitation à 750 rpm [195]. La quantité d'enzyme est de 15% de la masse en substrat soit 75 mg, l'activité de l'eau est de 0,5. L'activité de l'eau est fixée en début de réaction en équilibrant le substrat ainsi que la préparation enzymatique à l'aide de solution saline dans un dessiccateur. Le suivi des produits de synthèse (PC C18:2-C8, LPC C18:2) est réalisé par des prélèvements à des temps réguliers, les échantillons sont dilués dans du méthanol selon le protocole exposé dans le paragraphe 3.5.1 de cette partie puis analysés par HPLC (paragraphe 3.5.2 de cette partie).

4.3.2 Mise en place d'un plan d'expériences

Les paramètres optimaux de la réaction d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique ont été déterminés à l'aide d'un plan d'expériences.

Dans le cas présent, le système étudié est la réaction d'acidolyse ; deux réponses sont étudiées, la vitesse initiale de la réaction ainsi que le rendement en PC C18:2-C8.

Plusieurs paramètres peuvent influencer la réaction, tel que le rapport molaire acide caprylique/PC, la température, la quantité d'enzyme et l'activité de l'eau (a_w). Seules la température de la réaction et l'activité de l'eau ont été retenues à l'issue du bornage des paramètres. L'activité de l'eau de la préparation enzymatique et du substrat sont fixés en début de réaction à l'aide de solution saline contenue dans un dessiccateur.

La réaction entre l'acide caprylique et la phosphatidylcholine de tournesol, catalysée par une lipase est réalisée dans des tubes de 15 mL. Les variables indépendantes et leurs niveaux sont :

- Température de réaction : entre 25 et 55 °C
- Activité de l'eau : entre 0,5 et 0,9.

Le plan d'expériences qui a été réalisé est un plan factoriel complet. Il est composé d'un nombre limité de niveaux pour chaque facteur. Dans notre étude, le plan étudié est un plan 2^2 . Cela signifie que 2 facteurs ont été étudiés ayant chacun deux niveaux (Tableau 17). Le plan d'expériences est complété par 4 répétitions de l'expérience aux conditions moyennes, dites des « points centraux », ce sont des points situés au niveau 0 de chaque facteur. Ces 4 expériences permettent d'estimer la variabilité associée aux expériences.

La masse de substrat est fixée à 0,5 g et l'agitation à 750 rpm. Ces réactions sont réalisées dans des tubes de 15 mL dans un thermomixer C (Eppendorf, Montesso, France). La quantité d'enzyme est de 75 mg et le rapport molaire C8:0/PC est de 18. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

L'élaboration des plans d'expériences ainsi que la représentation et la modélisation des résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel Modde (Sigma Plus, Levallois-Perret, France).

Tableau 17 : Paramètres du plan d'expériences portant sur le modèle d'étude

Paramètres	Niveaux		
	-1	0	1
Température (°C)	25	40	55
Activité de l'eau-a _w	0,5	0,7	0,9

Avec ce plan, le nombre d'expériences est de 12 dont les 4 points au centre. Cette première série d'expériences a permis de balayer de manière globale l'influence de chaque paramètre afin d'identifier les paramètres ayant un rôle majeur dans la réaction.

4.4 Réaction d'estérification

La réaction d'estérification (Figure 23 du paragraphe 3.4.1 de cette partie) menant à l'obtention de caproyl-docosahexaenoyl-phosphocholine (PC DHA-C8) est réalisée dans un milieu fondu contenant de la glycérophosphocholine (GPC) avec du DHA et de l'acide caprylique. Cette réaction a été réalisée sous vide à une pression de 100 mbar à l'aide d'un multivapor P-12 muni d'une pompe V-700 (Buchi, Rungis, France). Le bain-marie est maintenu à une température de 45°C. L'agitation est maintenue à 450 rpm.

La GPC est préalablement solubilisée dans l'acide caprylique à une température comprise entre 85 et 90°C en présence d'un antioxydant, le sésamol à une concentration de 8,4 mM [61]. Ce mélange ainsi que la préparation enzymatique sont placés dans un dessiccateur contenant du gel de silicate pendant 24 h. Le DHA est alors ajouté. Le rapport molaire GPC/AG est de 1/18. La proportion entre chaque acide gras (DHA et acide caprylique) est étudiée. Le mélange de substrat est amené à la température attendue puis l'enzyme est ajoutée marquant ainsi le début de la réaction.

Le suivi des produits de synthèses (PC DHA-C8, PC DHA-DHA et LPC DHA) est réalisé par des prélèvements à des temps réguliers, les échantillons sont dilués dans du méthanol selon le protocole exposé dans le paragraphe 3.5.1 de cette partie puis analysés par HPLC (paragraphe 3.5.3 de cette partie).

Les rendements de synthèses sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{[\text{Produit de la réaction}]}{[\text{GPC}]} \times 100$$

III Résultats et discussions

1 Développement des méthodes analytiques

1.1 Suivi de l'acidolyse par HPLC

Afin de suivre l'évolution de l'acidolyse enzymatique, il a été nécessaire de développer une méthode d'analyse permettant la quantification des produits de la réaction à savoir les acides gras libérés et du substrat restant, c'est-à-dire le phospholipide natif. Dans le cadre de l'acidolyse de la PC de tournesol, il s'agira de s'intéresser aux principaux acides gras libérés que sont le C18:2, le C18:1, le C16:0 et le C18:0. Une méthode de séparation de ces différents acides gras a été mise au point par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur UV à 205 nm permettant la détection de molécules ayant une ou plusieurs insaturations et à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) qui lui, est universel. Les principaux acides gras retrouvés dans les phospholipides de *Tisochrysis lutea* ont également été intégrés à cette méthode analytique à savoir le C22:6 et le C14:0. L'acide caprylique (C8:0), incorporé aux phospholipides dans la réaction d'acidolyse, a également été étudié lors du développement de cette méthode. Enfin, dans le but de compléter cette analyse, le C17:0, pouvant servir d'étalon interne, a été intégré à cette étude ainsi que le C12:0, C20:0 et le C22:0. Ces 3 acides gras saturés permettent de voir le comportement d'acides gras à longue chaîne saturée. Cette méthode permet également la quantification du produit formé, la PC C18:2-C8.

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée en annexe I. La méthode a été validée selon les directives ICH (Conférence Internationale sur l'Harmonisation des critères d'homologation des produits pharmaceutiques à l'usage de l'homme). Dans ce cadre, la fiabilité de la méthode HPLC a été établie par sa spécificité, son étalonnage, sa limite de détection (LOD), sa limite de quantification (LOQ), la justesse, sa précision, sa robustesse et l'effet mémoire.

1.1.1 Optimisation des paramètres du DEDL

Un DEDL mesure la quantité de lumière diffusée par des particules de soluté passant à travers un faisceau de lumière. Ces particules de soluté sont obtenues par nébulisation de la phase mobile en sortie de la colonne suivie par l'évaporation du solvant des gouttelettes de liquide issues de la nébulisation. L'intensité de diffusion est liée à la concentration du soluté traversant le faisceau de lumière à un moment donné. La réponse du DEDL ne dépend donc pas des caractéristiques optiques de l'échantillon, et l'utilisation d'un solvant absorbant dans l'UV ne

gène donc pas l'analyse. Ainsi, le DEDL est compatible avec des gradients multisolvants permettant l'amélioration de la résolution et de la vitesse d'analyse. De plus, il permet la détection de molécules n'absorbant pas dans l'UV comme les acides gras saturés. Le DEDL présente néanmoins un inconvénient, il ne permet pas la détection de molécules plus volatiles que le solvant.

Pour réaliser l'analyse du mélange d'acides gras, il a été nécessaire d'optimiser le réglage des 3 paramètres du DEDL:

- La température de nébulisation
- La température d'évaporation
- Le débit d'azote (gaz de nébulisation).

Le réglage de ces paramètres est propre à chaque molécule comme le met en avant l'étude de Webster *et al.* [196], qui vise à déterminer les paramètres optimaux pour de nombreuses molécules pharmaceutiques.

1.1.1.1 Optimisation de la température de nébulisation et d'évaporation

Selon les préconisations du constructeur du DEDL, la température de nébulisation doit être égale à celle de l'évaporation et cette température ne doit pas excéder la température d'ébullition des solvants en présence. Le méthanol présente un point d'ébullition à 64,7°C. Ainsi, la réponse du DEDL a été testée pour des températures comprises entre 25 et 55°C.

Deux critères ont été considérés pour déterminer les valeurs optimales de température de nébulisation et d'évaporation. Ce sont, d'une part, la hauteur des pics et la symétrie des pics, d'autre part. En effet, lors de l'augmentation des températures, les pics présentent un élargissement à leur base et une diminution de hauteur. Or, la hauteur du pic est un paramètre important car les molécules les plus faiblement détectées ne se dégagent pas de la ligne de base et par conséquent, ne peuvent plus être détectées lorsque les températures de nébulisation et d'évaporation sont trop élevées. L'autre critère, pris en compte pour déterminer la température optimale de nébulisation et d'évaporation, est la symétrie des pics. En effet, une bonne symétrie des pics indique l'absence d'une éventuelle co-élution. En théorie, les pics doivent présenter une symétrie comprise entre 0,8 et 1,2. La symétrie des pics est donnée par le logiciel Agilent Chemstation. Afin d'étudier uniquement l'effet de la variation des températures, le débit d'azote a été maintenu à 1,1 Standard Liter per Minute (SLM).

Sur 11 acides gras testés, seulement 10 sont détectés. En effet, l'acide caprylique (C8:0) n'a pas été détecté dans les plages de concentration étudiées. Ceci serait dû à la longueur de sa chaîne carbonée. En effet, Bravi *et al.* [197] ont montré que le DEDL ne convient pas à l'analyse d'acides gras ayant une chaîne carbonée inférieure à 12 carbones. En deçà, les acides gras sont trop volatiles pour ce détecteur. Les acides gras ayant une chaîne plus courte ne sont pas détectés car ils sont évaporés totalement ou partiellement avec le solvant.

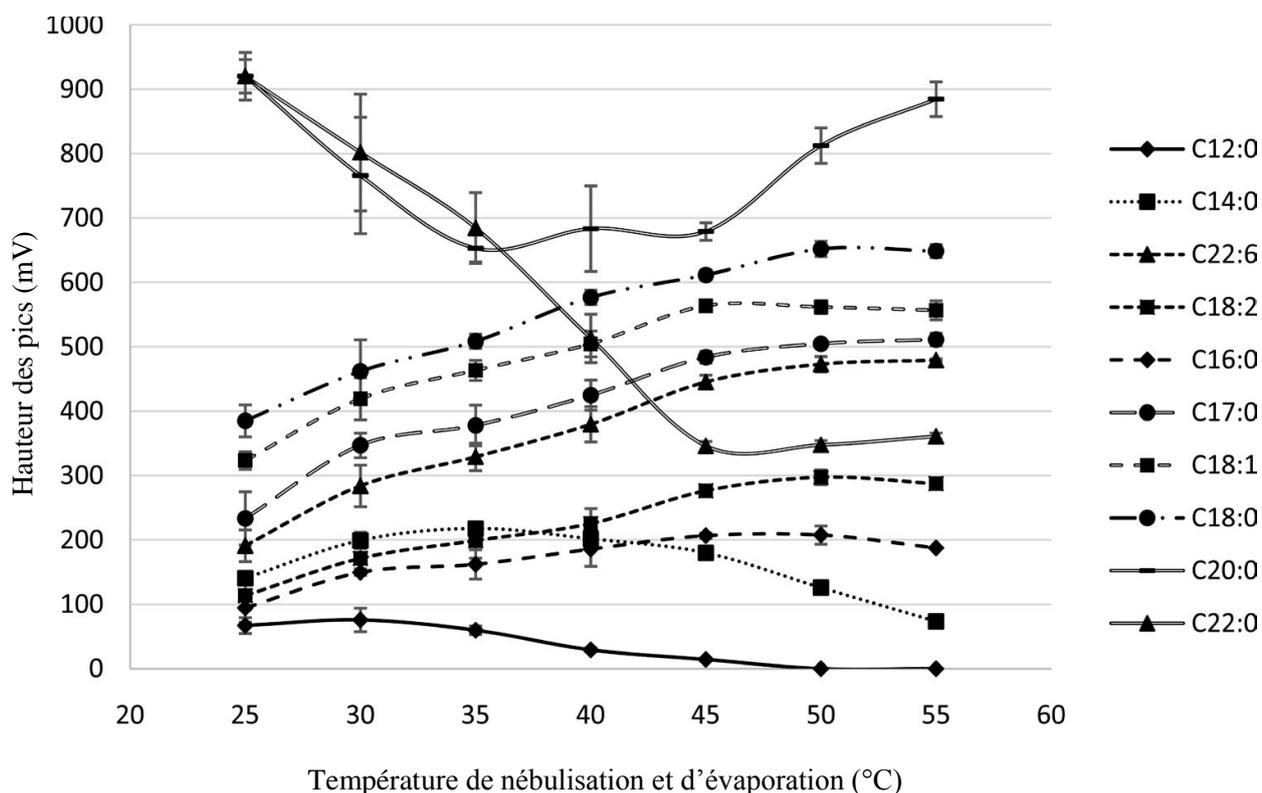


Figure 26 : Effet de la température d'évaporation et de nébulisation sur la hauteur des pics (température colonne : 25°C ; débit d'azote : 1,1 SLM ; concentration : 2 mM). Des triplicats indépendants ont été réalisés.

La hauteur des pics augmente avec la température excepté pour quatre acides gras : l'acide laurique (C12:0), l'acide myristique (C14:0), l'acide arachidique (C20:0) et l'acide béhénique (C22:0) (

Figure 26). Les réponses particulières de ces 4 acides gras n'ont pas été expliquées.

Il apparaît toutefois que les températures d'évaporation et de nébulisation ne peuvent excéder 50°C. En effet, au-delà, l'acide laurique (C12:0), qui est l'acide gras présentant la plus courte chaîne des acides gras considérés, n'est plus détecté. Ce résultat n'a pas pu être comparé à la bibliographie, peu de publications s'intéressent à la détection des acides gras avec un DEDL.

Les températures de 30°C et 35°C peuvent convenir, en effet, elles permettent toutes deux de bénéficier d'une réponse significative pour l'acide laurique, l'acide gras dont la réponse est la plus faible. De plus, à ces 2 températures, la symétrie des pics de l'ensemble des acides gras est bien comprise entre 0,8 et 1,2. Toutefois, la symétrie étant légèrement meilleure à 35°C qu'à 30°C, c'est à 35°C que sera réglée la température de nébulisation et d'évaporation.

1.1.1.2 Optimisation du débit d'azote

L'influence du débit d'azote a ensuite été étudiée en fixant la température d'évaporation et de nébulisation à 35°C suite aux résultats précédents. Le débit du gaz de nébulisation détermine la taille des gouttelettes dans le nuage de nébulisation. En théorie, un signal plus élevé est obtenu en réduisant le débit de gaz [198]. Selon les recommandations du fabricant, il est toutefois conseillé de maintenir le débit d'azote entre 1 et 2 SLM.

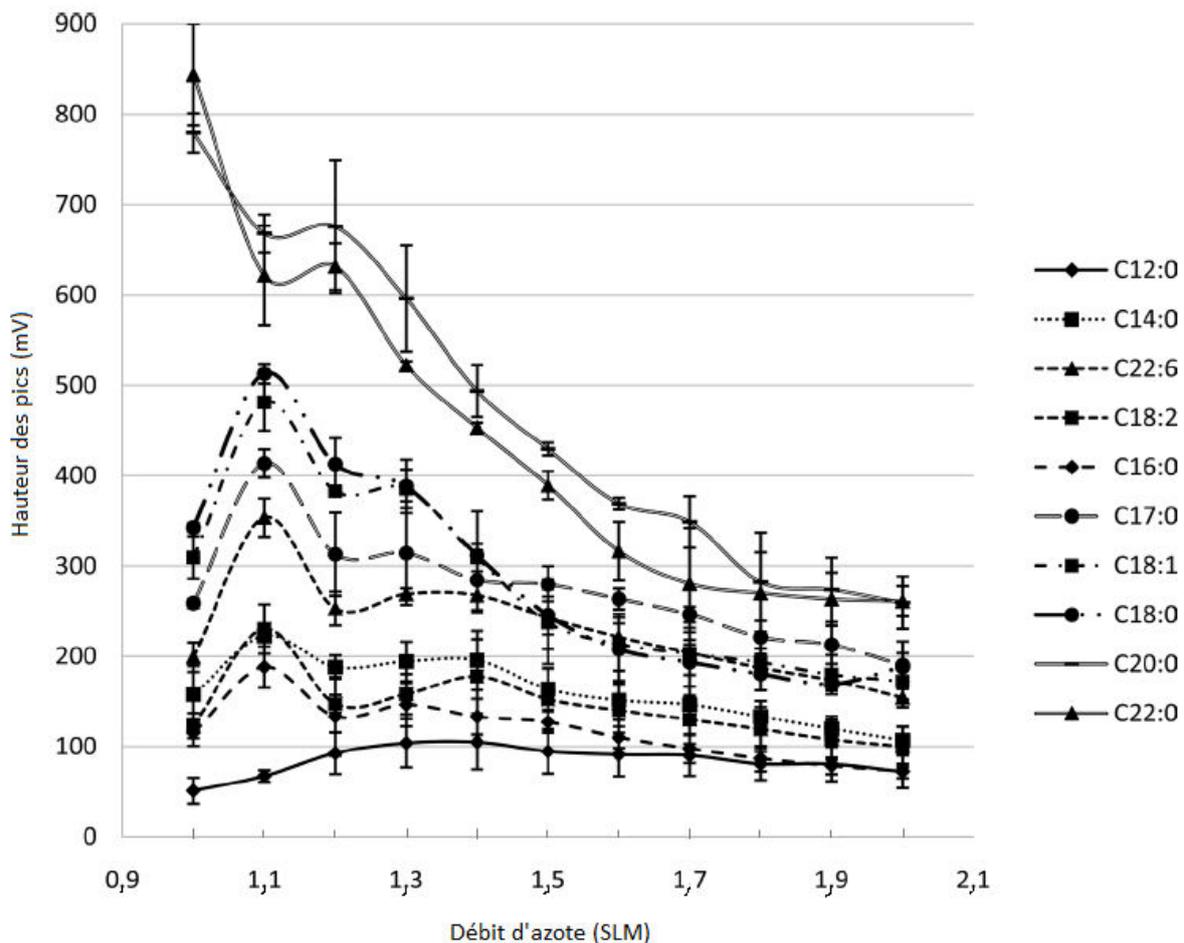


Figure 27 : Influence du débit d'azote sur la hauteur des pics (température de colonne : 25°C ; température d'évaporation et de nébulisation : 35°C)

Les résultats présentés sur la Figure 27, montrent qu'en termes de hauteur de pic, la meilleure réponse du DEDL est obtenue pour un débit de 1,1 SLM pour l'ensemble des acides gras

excepté pour l'acide laurique (C12:0), l'acide arachidique (C20:0) et l'acide béhénique (C22:0). Pour l'acide laurique, l'augmentation du débit d'azote au-delà de 1,1 SLM n'améliore pas significativement la hauteur de pic. Pour l'acide béhénique et l'acide arachidique dont la réponse diminue entre 1 SLM et 1,1 SLM, leur réponse reste élevée et n'impacte pas négativement leur détection qui est par ailleurs très bonne.

1.1.2 Optimisation de la température de la colonne

D'après les recommandations du fabricant du DEDL, il est important que la température de la phase mobile en sortie de colonne ne présente pas un écart trop important avec la température de nébulisation et d'évaporation. De plus, la température de la colonne affecte également l'efficacité de la séparation chromatographique. C'est pourquoi, la réponse étudiée pour déterminer la température optimale de la colonne est le nombre de plateaux théoriques et non plus la hauteur des pics. Rappelons ici, que plus le nombre de plateaux est élevé, meilleure est la résolution des pics.

Le nombre de plateaux théoriques est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de plateaux théoriques} = 5,54 (t_r/w_{1/2})^2$$

Avec t_r = Temps de rétention

$W_{1/2}$ = Largeur du pic à mi-hauteur

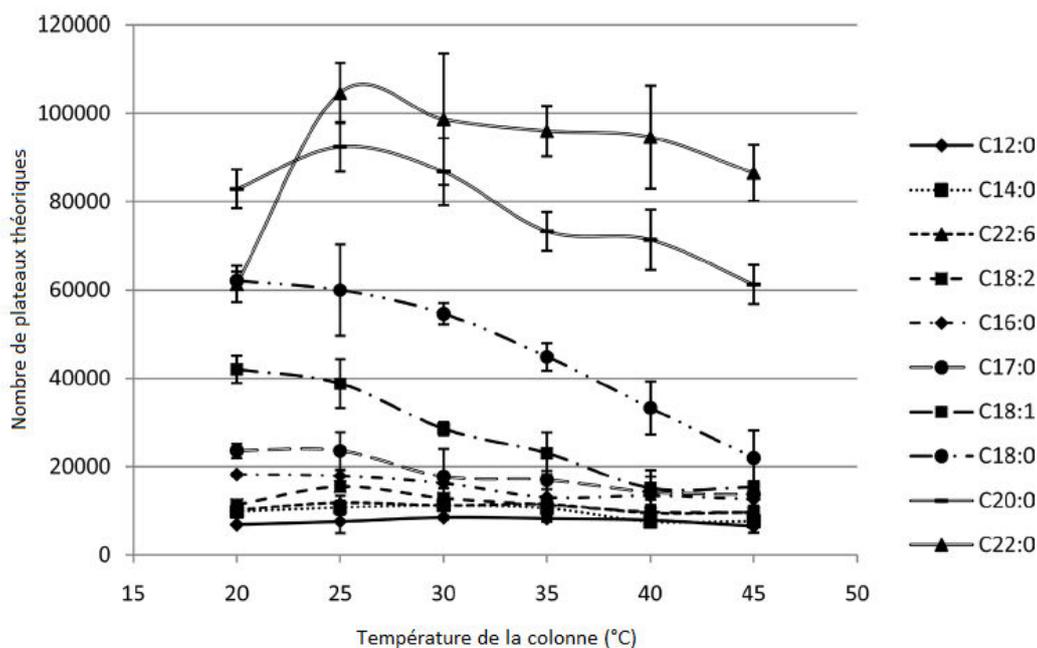


Figure 28 : Influence de la température de la colonne sur le nombre de plateaux théoriques (température de nébulisation et d'évaporation : 35°C ; débit d'azote : 1,1 SLM)

La Figure 28 met en évidence qu'avec une augmentation de la température de colonne, le nombre de plateaux théoriques diminue pour 3 acides gras. Un optimum est atteint pour l'acide béhénique (C22:0) et l'acide arachidique (C20:0) à 25°C. Pour le C12:0, le C14:0, le C22:6 et le C16:0, le nombre de plateaux théoriques est constant pour les températures de 20°C et 25°C. Pour choisir en termes de température de colonne entre 20 ou 25°C, la résolution entre les acides gras dont la séparation est critique a été considérée. Aucune différence n'est observée entre ces deux températures. La température de la colonne est donc fixée à 25°C qui est plus proche de la température d'évaporation du DEDL.

1.1.3 Séparation des acides gras

La séparation par HPLC avec une détection par un DEDL des 10 acides gras considérés est montrée sur le chromatogramme de la Figure 29. L'ordre d'élution est le suivant : C12:0, C14:0, C22:6, C18:2, C16:0, C17:0, C18:1, C18:0, C20:0 et C22:0. Tous les acides gras sont élués en 10,5 min sans dérive de ligne de base malgré l'utilisation d'un gradient de solvant. En outre, l'ensemble des pics est bien résolu.

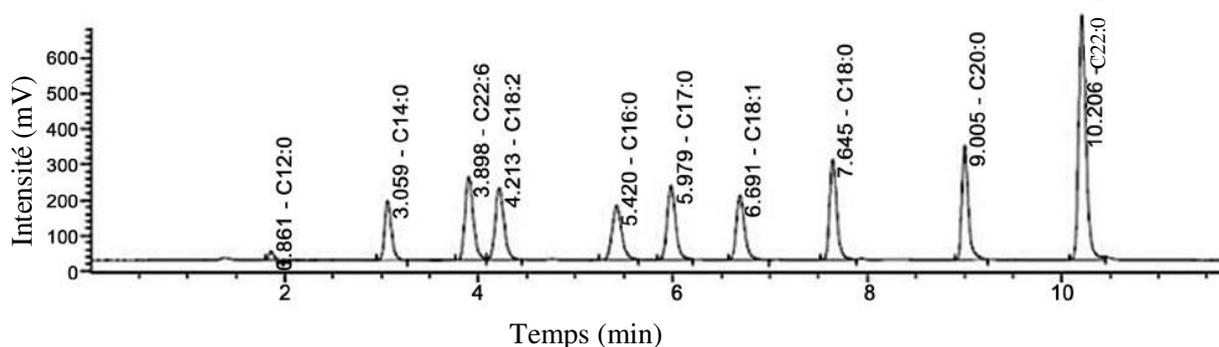


Figure 29 : Chromatogramme obtenu par HPLC sur colonne Poroshell 120 couplée à un DEDL d'un mélange de standards de 10 acides gras libres (2mM). Volume d'injection : 5µL. Débit d'élution : 1 mL/min

L'addition de TFA dans les solvants d'élution permet d'améliorer la résolution des pics. En effet, il a pour rôle d'ioniser les groupes carboxyliques et ainsi de modifier la polarité des molécules en s'assurant que tous les groupes carboxyliques soient sous la forme COOH. Cela permet d'affiner les pics. Il est intéressant de remarquer que la durée de l'analyse n'est que de 10,5 minutes. Cela est dû à l'utilisation d'une colonne de type Core-Shell (50 x 4,6 mm; 2,7 µm) permettant de réduire la taille ainsi que la granulométrie de la colonne. Une technologie classe présente des billes des silices entièrement poreuses. Dans le cas d'une technologie Core-Shell, la bille de silice présente un noyau dure de 1,7µm de diamètre. Ce noyau est recouvert d'une couche poreuse de 0,5 µm.

1.1.4 Validation de méthode

Une fois les conditions d'analyses définies (gradient d'éluion et réglages du DEDL), la méthode a été validée en suivant le guide ICH.

1.1.4.1 Spécificité de la méthode

La spécificité d'une méthode correspond à son aptitude à mesurer le composé d'intérêt sans qu'il y ait d'interférence avec les autres constituants de l'échantillon. Pour l'étude portant sur l'acidolyse des phospholipides de tournesol, il a été vérifié que les acides gras étudiés n'étaient pas co-élus avec les phospholipides de tournesol ainsi qu'avec le produit néosynthétisé, la PC C8-C18:2.

1.1.4.2 Etalonnage

La réponse du DEDL est dépendante de la taille des molécules étudiées. Ainsi, il est important de réaliser des gammes d'étalonnages pour chaque acide gras étudié (Figure 30). Le caractère non linéaire des courbes de régression avec le DEDL est un phénomène connu et le modèle empirique qui décrit le mieux la réponse de ce type de détecteur est un modèle polynomial de la forme :

$$\text{Aire} = a[\text{Acide gras}]^b [199]$$

La régression polynomiale pour les gammes d'étalonnage a été réalisée à l'aide du logiciel Excel donnant ainsi les valeurs de b et de a pour chaque acide gras. Les r^2 sont tous supérieurs à 0,9975 (Tableau 18).

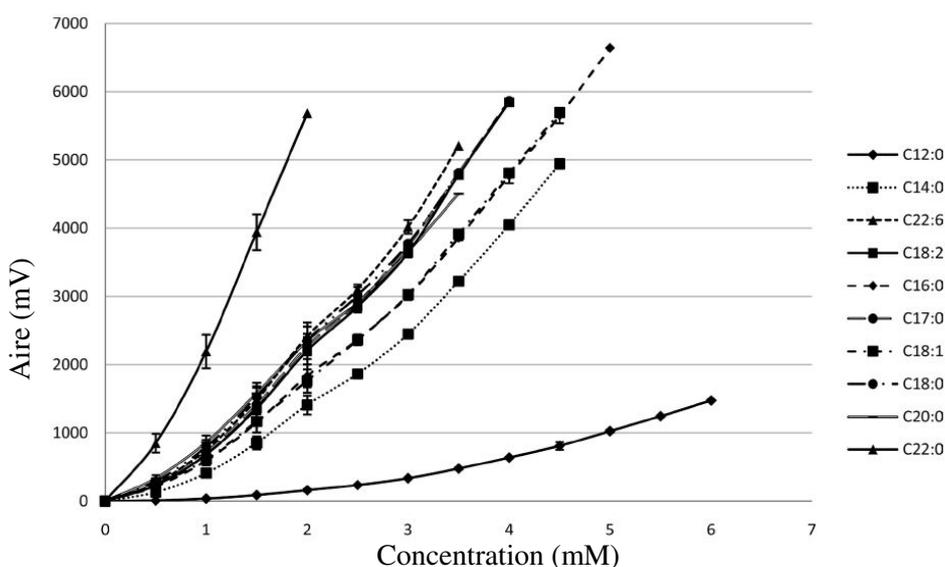


Figure 30 : Courbes de calibration pour les 10 acides gras considérés

1.1.4.3 Limite de détection et limite de quantification

Les limites de quantification (LOQ) et de détection (LOD) ont été déterminées par une approche signal sur bruit. Lorsque la longueur de chaîne des acides gras est supérieure à 14 carbones, la sensibilité est satisfaisante avec une LOQ comprise entre 0,03 et 0,3 mM (Tableau 18). Lorsque les chaînes sont plus courtes comme c'est le cas pour l'acide laurique (C12:0), la volatilité de la molécule est plus importante et les LOD et de LOQ augmentent considérablement. Ainsi, la quantification de l'acide laurique nécessite une quantité minimale de 0,7 mM pour que la quantification soit précise.

Tableau 18 : Données d'étalonnage, limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), précision et justesse

Acides gras libres	t _r (min)	Régression	r ²	LOD (mM)	LOQ (mM)	Répétabilité CV (%) n=6	Reproductibilité CV (%) n=6	Justesse (%R)
C12:0	1,813	y=38,612x ^{2.0221}	0,9994	0,5	0,7	1,50	4,25	95
C14:0	2,92	y=417,72x ^{1.6449}	0,9990	0,09	0,3	1,50	1,97	89
C22:6	3,615	y=768,33x ^{1.5422}	0,9986	0,03	0,1	1,15	1,44	96
C18:2	3,962	y=695,04x ^{1.5482}	0,9986	0,03	0,3	0,92	1,89	98
C16:0	5,049	y=609,37x ^{1.4852}	0,9992	0,07	0,3	1,68	1,94	95
C17:0	6,411	y=726,24x ^{1.5232}	0,9985	0,07	0,09	1,41	1,05	99
C18:1	5,646	y=645,19x ^{1.4391}	0,9991	0,01	0,09	1,38	1,73	99
C18:0	7,428	y=808,74x ^{1.4435}	0,9982	0,02	0,1	0,78	1,62	97
C20:0	8,871	y=871,02x ^{1.3356}	0,9975	0,01	0,03	1,05	1,46	81
C22:0	10,069	y=2222x ^{1.3939}	0,9998	0,01	0,03	0,82	2,32	98

1.1.4.4 Justesse

L'exactitude (ou justesse) de la méthode évalue si la valeur attendue est proche de la valeur trouvée. Elle est exprimée en calculant pour chaque composant le pourcentage de recouvrement (%R). Dans le cas présent, 6 analyses successives de la solution standard contenant les 10 acides gras à une concentration de 2 mM en présence de lécithine de tournesol ont été réalisées. Le pourcentage de recouvrement est calculé comme suit :

$$\% R = (\text{Concentration mesurée} / \text{concentration attendue}) \times 100$$

Les résultats présentés dans le Tableau 18 indiquent que les valeurs de recouvrement se situent entre 95 et 99% pour la majorité des acides gras. Seuls le C14:0 et le C20:0 présentent des

valeurs inférieures, de 89 et 81% respectivement. Ces résultats permettent de conclure que l'exactitude de la méthode proposée est acceptable.

1.1.4.5 Précision

La répétabilité ainsi que la reproductibilité de la méthode ont été étudiées afin d'évaluer la précision de la méthode. Les résultats sont exprimés en coefficient de variation (CV%). Les valeurs du CV ne dépassent pas 1,68% pour ce qui concerne la répétabilité et 4,25% concernant la reproductibilité (Tableau 18).

1.1.4.6 Robustesse

La robustesse permet de juger la stabilité de la procédure analytique lors de légères variations. Dans le cas présent, 3 paramètres ont été étudiés : le pourcentage d'eau en début d'analyse et le débit de la phase mobile ainsi que la température de la colonne. Ces paramètres ont été modifiés un à un et leur effet a été observé sur chaque acides gras. Tous les essais ont été effectués en triplicat et les résultats sont exprimés en pourcentage de recouvrement (%R).

Les résultats sont présentés dans le Tableau 19. La variation du débit affecte le pourcentage de recouvrement de -7 à +5%. Lors du changement de la température de la colonne, le taux de recouvrement varie entre 96 et 106%. Pour finir, celui-ci varie entre 87% et 114% lorsque le pourcentage d'eau de la phase mobile est modifié. Cette méthode est donc robuste lorsque la température de la colonne ou le débit de phase mobile est modifié mais le pourcentage d'eau contenu dans la phase mobile doit être soigneusement contrôlé. La résolution des pics de C22:6 et C18:2 qui peut-être le point critique de cette méthode reste au-dessus d'une valeur critique de 1,5.

Tableau 19 : Tests de robustesse

	Débit de la phase mobile (mL.min ⁻¹)		Température de la colonne (°C)		% Méthanol + TFA (0,05%) au début du gradient		Conditions de la méthode
	0.9	1.1	24	26	12	14	
<i>%R</i>							
C12:0	96	101	96	99	87	109	100
C14:0	97	99	100	101	91	109	100
C22:6	103	102	100	101	88	111	100
C18:2	101	101	100	102	90	114	100
C16:0	98	93	103	96	106	99	100
C17:0	105	96	99	97	107	90	100
C18:1	100	99	106	99	101	90	100
C18:0	102	100	101	99	105	94	100
C20:0	102	100	103	102	101	99	100
C22:0	103	102	102	99	103	92	100
<i>Resolution (acide linoléique et docosahexaénoïque)</i>							
	1,75	1,86	2,15	1,91	1,9	2,15	2,02

1.1.4.7 Effet mémoire

Lors d'une validation de méthode analytique, il est important de vérifier que l'analyse du précédent échantillon n'affecte pas l'analyse en cours. Ainsi, dans le cas présent, l'effet mémoire a été étudié en injectant un blanc ne contenant que du solvant après un échantillon contenant des acides gras à une concentration deux fois plus importante que les valeurs hautes des gammes d'étalonnage. Aucun signal n'est observé dans les blancs injectés après l'analyse de ces échantillons très concentrés. Ainsi, il peut être conclu qu'il n'y a pas d'effet mémoire avec la méthode développée.

Cette méthode permet la séparation de 10 acides gras, dont la chaîne carbonée est comprise entre 12 et 22 carbones, en 10,5min. C'est une méthode facile à mettre en œuvre et qui s'avère précise et sensible. La robustesse est assurée en termes de variation de température de la colonne et de débit de la phase mobile. Il faut toutefois veiller au pourcentage d'eau dans la phase

mobile, qui est un point critique de cette méthode. Des méthodes plus sensibles existent, cependant, elles nécessitent le plus souvent des étapes pré-analytiques telle que la dérivation pour la fluorescence ou des équipements beaucoup plus coûteux que le DEDL.

1.1.5 Elution des phospholipides

La méthode présentée dans les paragraphes précédents (1.1.1, 1.1.2 et 1.1.3) a été modifiée dans le but d'éluer également les phospholipides dans le cadre du suivi d'une acidolyse de phosphatidylcholine de tournesol avec de l'acide caprylique. Le début du gradient reste inchangé permettant ainsi l'identification et la quantification des acides gras. Pour éluer les phospholipides de tournesol, après les 10,5 min d'élution des acides gras, le gradient est maintenu à 100% de méthanol pendant 4 min puis ramené aux proportions en solvant initiales sur la fin du gradient. C'est donc avec ce nouveau gradient que les phospholipides vont être élués comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes (3.5.2).

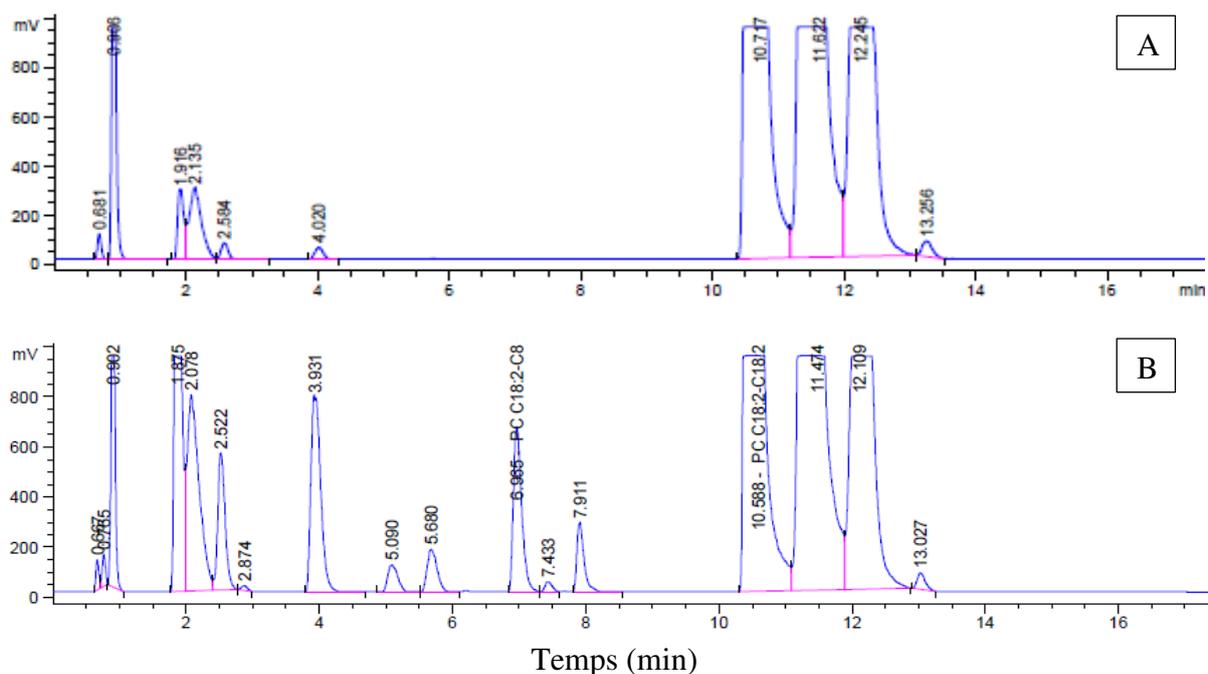


Figure 31 : Chromatogrammes d'échantillons d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique au temps initial de la réaction (A) et après 8h de synthèse (B) obtenu par HPLC-DEDL (colonne Poroshell 120)

Au temps $t=0h$ de la réaction (Figure 31 A), seul les phospholipides de tournesol et des lysophospholipides sont observés sur le chromatogramme. Sur la Figure 31B, on peut distinguer 4 groupes de molécules, ceux présents au temps $t=0h$ mais apparaissent également 2 groupes de molécules au cours de l'acidolyse, les acides gras libres et les phospholipides néosynthétisés. Ainsi est retrouvé sur la Figure 31 B :

- Les phospholipides de tournesol qui sont élués après 10 min
- Les phospholipides néosynthétisés contenant de l'acide caprylique dont les temps de rétention sont compris entre 6,8 et 8,5 min tel que la PC C18:2-C8 dont le temps de rétention est de 6,9 min
- Les acides gras libérés au cours de la synthèse dont les temps de rétention sont compris entre 3,7 et 6 min
- Les LPC dont les temps de rétention sont compris entre 1,7 et 2,6 min. Ces LPC sont la conséquence d'une réaction d'hydrolyse s'installant en parallèle de la réaction d'acidolyse.

Les acides gras libérés au cours de la réaction d'acidolyse sont d'après les temps de rétention obtenus et d'après le Tableau 18, l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide oléique. Ce sont en effet, les acides gras majoritaires des PC de tournesol (Figure 32). La composition en acides gras des PC de tournesol a été déterminée par CPG.

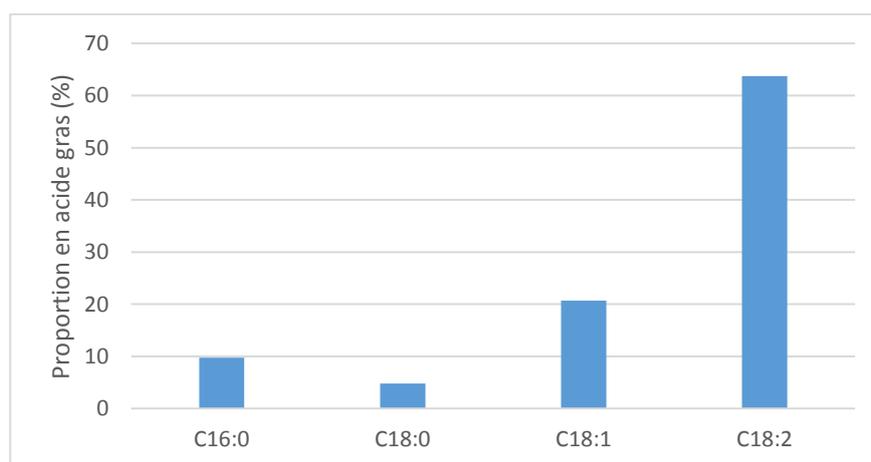


Figure 32 : Profil en acides gras des phosphatidylcholines de tournesol obtenu par CPG

1.2 Détermination des espèces moléculaires obtenues par estérification

La PC DHA-C8 synthétisée lors de la réaction d'estérification a été analysée par UHPLC-MS afin de confirmer l'espèce moléculaire en présence. En l'absence d'étalon commercial de cette molécule, il est important de s'assurer de la masse de la molécule synthétisée car c'est à partir des PC DHA-C8 obtenues par estérification qu'a été déterminé le temps de rétention de cette molécule avec la méthode chromatographique utilisée pour suivre l'acidolyse des phospholipides microalgaux. En d'autres termes, la PC DHA-C8 obtenue par estérification sert

de standard. Un co-produit de la réaction, la LPC DHA a également été analysée en UHPLC-MS.

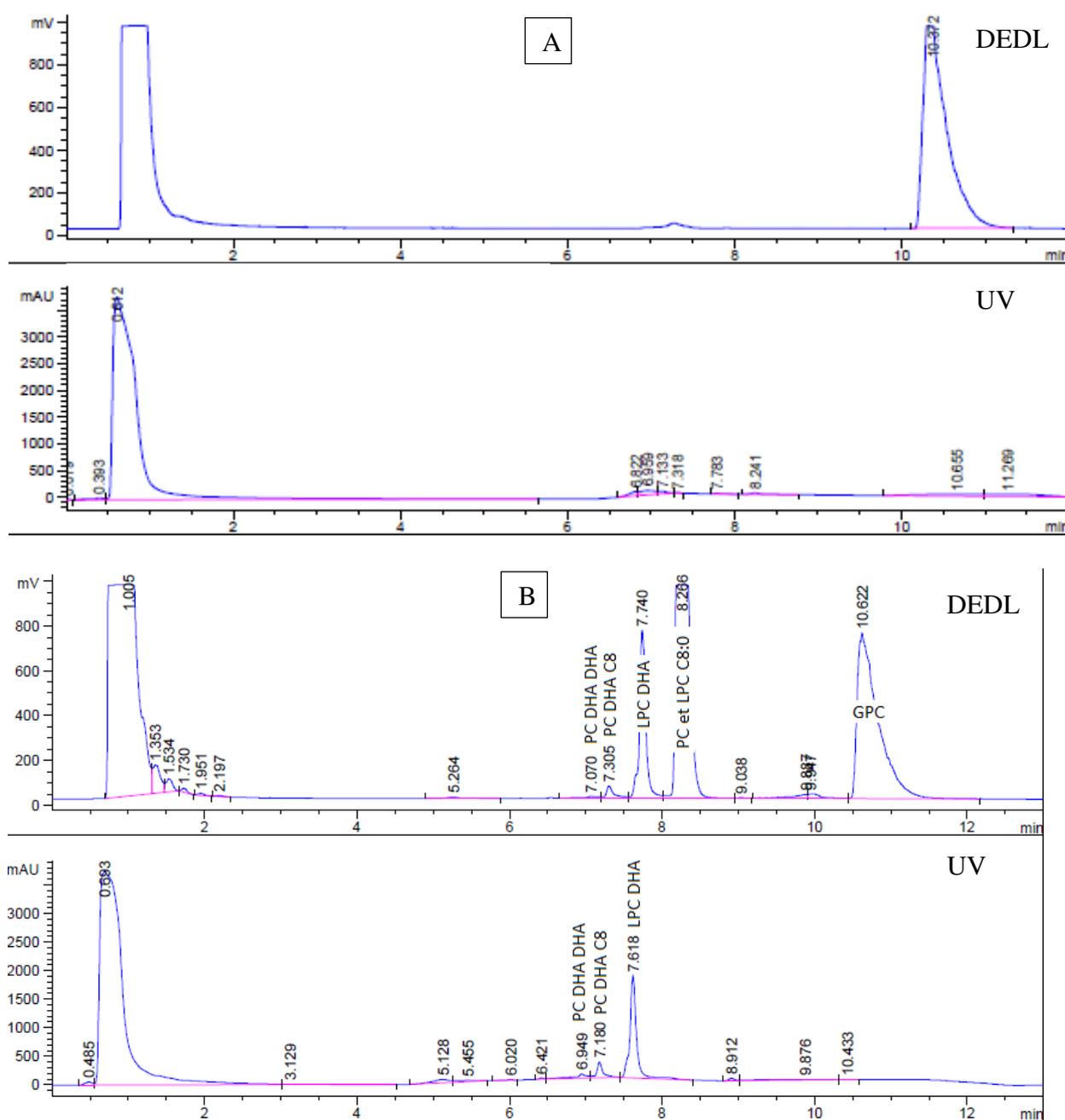


Figure 33 : Chromatogrammes au temps 0 (A) et après 8 heures de réaction (B) d'échantillons d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA obtenus par HPLC-DEDL-UV (colonne HILIC)

Les échantillons de la réaction d'estérification ont été analysés, dans un premier temps, par HPLC et l'étude des chromatogrammes a permis d'identifier, par déduction, les temps de rétention des différents produits de la réaction. Cette identification est basée sur l'hydrophilie des molécules. En effet, étant toutes composées de GPC, c'est grâce à leur chaîne acylée qu'elles vont être séparées. Ainsi, les PC étant composées de 2 chaînes acylées sont plus

apolaires que les LPC qui n'en comportent qu'une. Le DHA étant plus apolaire que l'acide caprylique, la PC DHA-DHA a un temps de rétention plus faible que celui de la PC DHA-C8. La LPC DHA a un temps de rétention plus important que la PC DHA-C8. La Figure 33 montre un chromatogramme d'échantillon de synthèse au temps 0 (A) et après 8h de réaction (B). Sur les chromatogrammes DEDL, toutes les molécules sont détectées tandis qu'en UV seules les molécules ayant une ou plusieurs doubles liaisons sont détectées. Ainsi, en UV après 8 h de réactions sont identifiées la LPC DHA à 7,6 min, la PC DHA-C8 à 7,1 min et la PC DHA-DHA à 6,9 min. Le pic à 0,6 min correspond au DHA qui est présent en excès et qui est élué dans le volume mort de la colonne.

Afin de vérifier les hypothèses formulées quant aux temps de rétention des différents produits obtenus, les produits d'intérêt ont été purifiés puis envoyés à l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans (IMMM) afin d'être analysés par UHPLC/MS-ESI ou pour la LPC DHA en MS/MS par infusion directe.

1.2.1 Purification des espèces moléculaires de phospholipides

Une purification partielle ou complète des produits de synthèse est nécessaire avant toute analyse par UHPLC/MS. En effet, les acides gras sont en large excès dans les réactions réalisées et une injection directe des échantillons en UHPLC-MS conduirait à un encrassement du détecteur rendant impossible la caractérisation des molécules d'intérêt. Une étape de purification par chromatographie sur colonne basse pression est donc réalisée afin d'éliminer ces acides gras.

L'éluion des produits de synthèse est réalisée avec 2 mélanges de solvants. Le premier mélange de solvant composé de cyclohexane/isopropanol (1/1) permet l'éluion des acides gras libres à savoir le DHA et l'acide caprylique. Le deuxième mélange de solvants composé de chloroforme/méthanol/eau (65:35:5) permet l'éluion des phospholipides. Chaque fraction recueillie a un volume de 5 mL. Les fractions 7 à 15 présentées sur la Figure 34 ont été éluées avec le deuxième mélange de solvant.

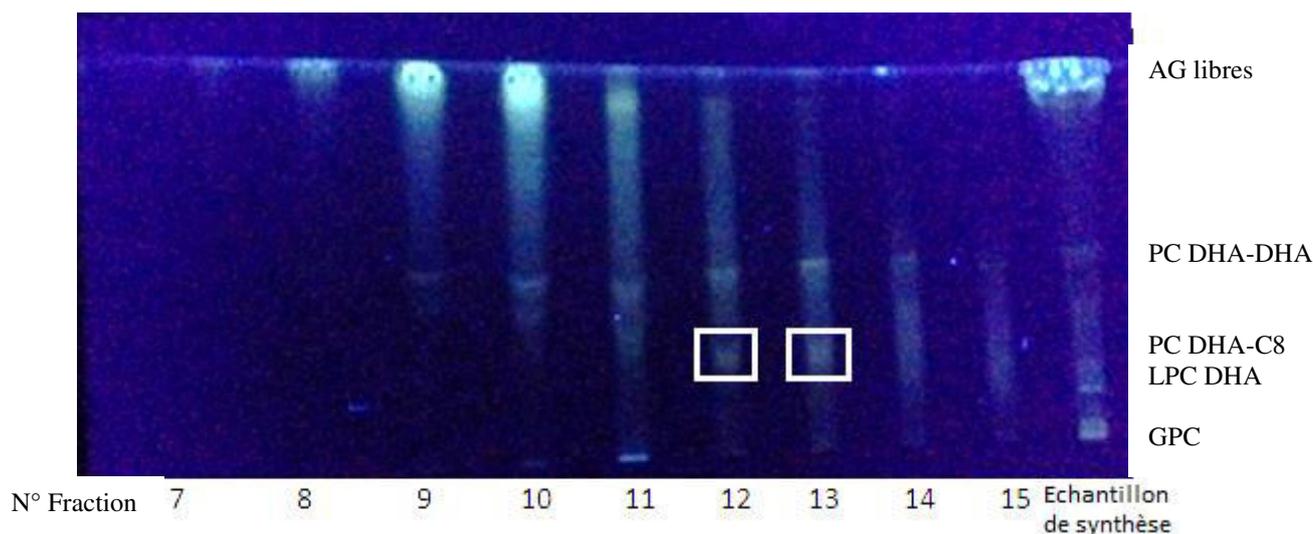


Figure 34 : Chromatographie sur couche mince des fractions de purification de la synthèse de PC DHA-C8 ($\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 65/35/5)

Les fractions 12 et 13 sont les seules présentant un spot dont le rapport frontal pourrait correspondre à la PC DHA-C8. De plus, à partir de ces deux fractions, la totalité des acides gras libres est éluée. Ces deux fractions ont donc été utilisées pour la suite du travail mais la PC DHA-DHA et la PC DHA-C8 sont co-éluées dans celles-ci, c'est pourquoi il est nécessaire de réaliser une analyse par UHPLC-MS et non une infusion directe qui nécessite que le produit analysé soit pur. Une infusion directe consiste en l'introduction dans la source du spectromètre de masse d'un échantillon pur, sans séparation préalable. L'UHPLC-MS séparant les molécules en amont de l'analyse par le spectromètre de masse, il sera alors possible de déterminer pour un temps de rétention donné la masse de la molécule.

Pour des raisons techniques, il était préférable de passer les échantillons en UHPLC-MS avec la colonne Poroshell 120 (phase inverse). Or le suivi des réactions d'estérification a été réalisé sur une colonne en phase HILIC. Ainsi, il était nécessaire de connaître les temps de rétention de la PC DHA-C8 et de la LPC DHA sur la colonne Poroshell 120 et sur la colonne HILIC à partir d'un même échantillon. Une fraction ne contenant que de la LPC DHA a été analysée sur la colonne en phase inverse, cela a permis de déduire les temps de rétention de chacun des 2 produits. La Figure 35 présente les chromatogrammes HPLC de la fraction 12 sur phase HILIC (A) et en phase inverse (B). Sur la Figure 35 A, les deux pics co-élués sont la PC DHA-DHA et la PC DHA-C8. Ce problème de co-élution sur la colonne HILIC n'a pas été observé au cours de l'analyse des échantillons de synthèse car ils sont beaucoup moins concentrés, en effet, il est nécessaire de diluer l'échantillon avant analyse. Le pic suspecté être de la PC DHA-C8 a un temps de rétention de 7,2 min. Le pic ayant un temps de rétention de 6,9 min a été identifié comme étant de la PC DHA-DHA en comparaison avec un standard commercial.

Sur la Figure 35 B, le chromatogramme obtenu en phase inverse présente un pic ayant un temps de rétention de 16,4 min qui est la PC DHA-DHA, le pic suspecté être de la PC DHA-C8 a un temps de 10,6 min, le pic à 6,5 min serait de la LPC DHA. Cette étape permet de s'assurer de pouvoir transposer les résultats obtenus en LC-MS sur colonne en phase inverse sur la colonne en phase HILIC.

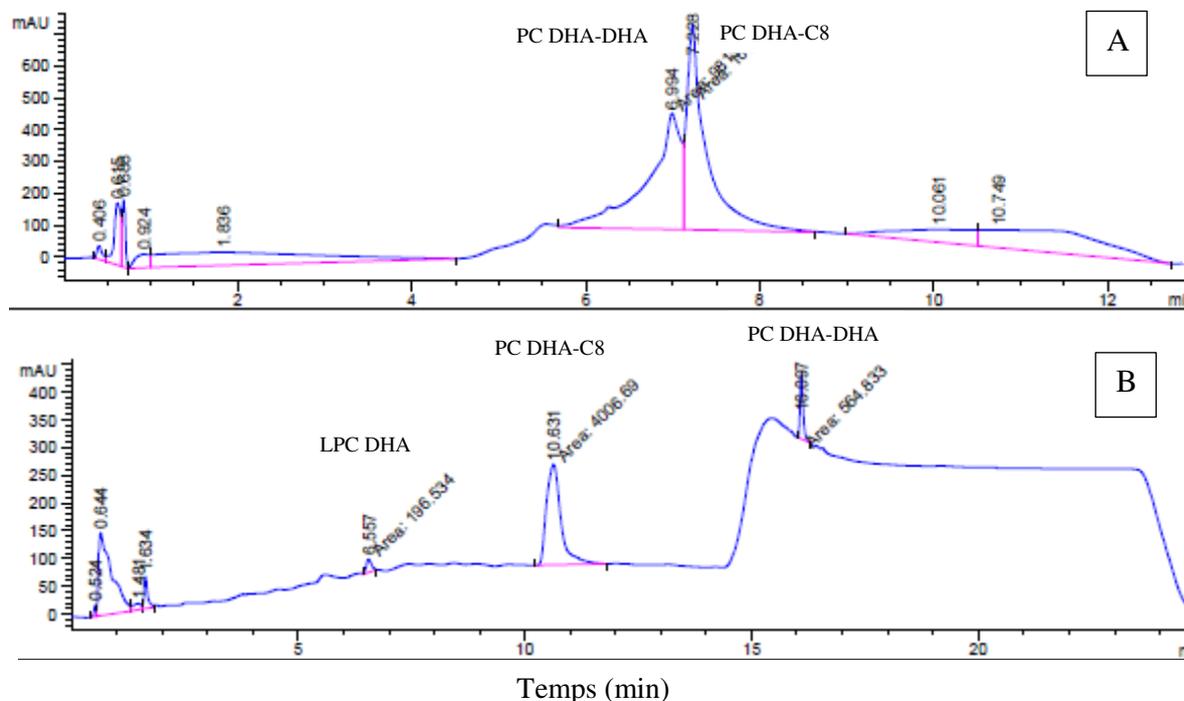


Figure 35 : Chromatogrammes UV de l'analyse HPLC sur colonne en phase HILIC (A) et en phase inverse (B) de la fraction 12 obtenue après purification de l'échantillon de la réaction d'estérification

1.2.2 Caractérisation de la PC DHA-C8

Le couplage UHPLC/MS permet de déterminer quelles espèces moléculaires sont retrouvées dans un échantillon présentant un mélange de phosphatidylcholines. La choline est un groupement particulièrement bien détecté lorsque l'analyse est réalisée en mode positif. L'ajout d'acide formique à la phase mobile lors de l'élution favorise la formation d'adduit cationique permettant ainsi à des molécules ne possédant pas de site ionisable d'être ionisées.

Sur la Figure 36, le composé supposé être de la PC DHA-C8 de masse moléculaire m/z : 693 présente un pic majoritaire d'un ion ayant un rapport masse sur charge de m/z : 694 qui correspond à l'ion pseudo-moléculaire $[M+H^+]$. Ce résultat est corroboré par la présence de l'ion m/z : 716 correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na^+]$. Ainsi, le composé identifié sur les chromatogrammes HPLC sur phase HILIC pour un temps de rétention de 7,2 min est bien de la PC DHA-C8.

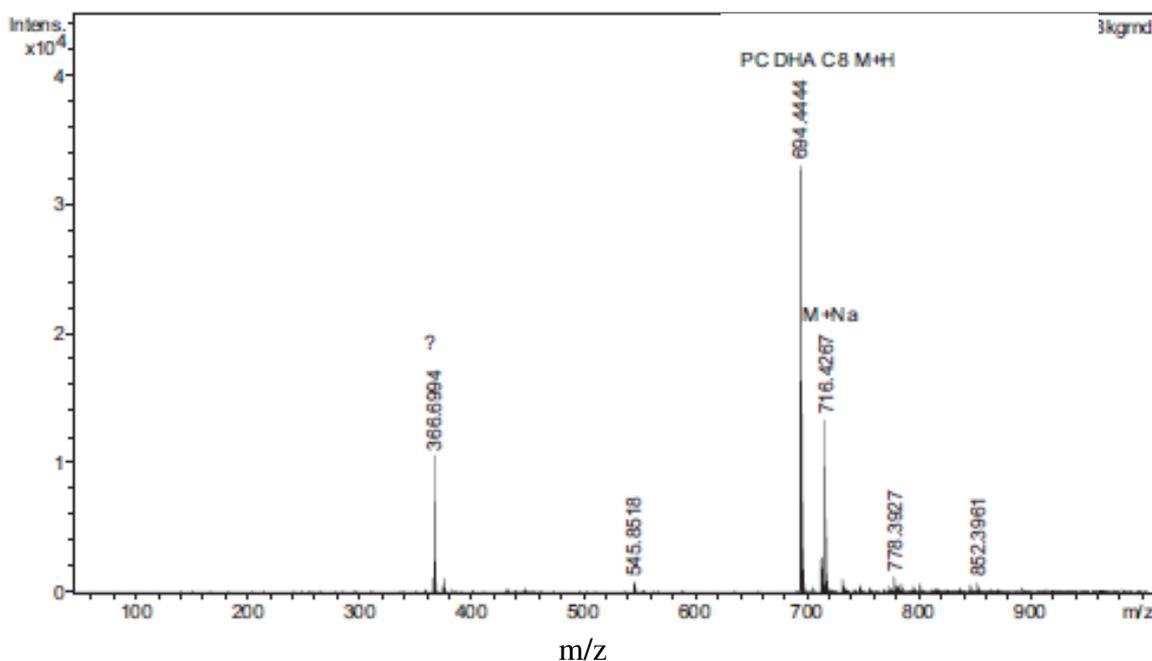


Figure 36 : Spectre ESI-MS de la PC DHA-C8, acquisition en mode positif

1.2.3 Caractérisation de la LPC DHA

L'analyse ESI-MS de la LPC DHA a été effectuée. Le procédé de purification de la LPC DHA a permis d'obtenir une fraction ne contenant qu'une seule espèce moléculaire permettant ainsi une analyse en infusion directe. Un pic majoritaire d'un ion ayant un rapport masse sur charge de $m/z=590,32$ (Figure 37 A) est observé, ce qui correspond à l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$. Ce résultat est confirmé par la présence de l'ion $m/z : 568,33$ qui correspond à l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$. L'analyse par spectrométrie de masse en tandem permet de déterminer le régio-isomère en présence (lysophospholipide portant l'acyle en position sn-1 ou sn-2). Ainsi, Han et Gross [200] ont étudié les voies de dissociation de la 1-LPC et de la 2-LPC induite par les collisions. Ils ont mis en évidence que les 1-LPC présentaient des ions de masse $[M+Na-59]$, $[M+Na-183]$ et $[M+Na-205]$ tandis que les espèces moléculaires 2-LPC ont uniquement pour ions secondaires du $[M+Na-59]$ et $[M+Na-205]$.

Dans le cas présent, les ions secondaires observés ont des masses de $[M+Na-59]$, $[M+Na-183]$ et $[M+Na-205]$ (Figure 37 B). La LPC DHA synthétisée porterait la chaîne acyle en position sn-2.

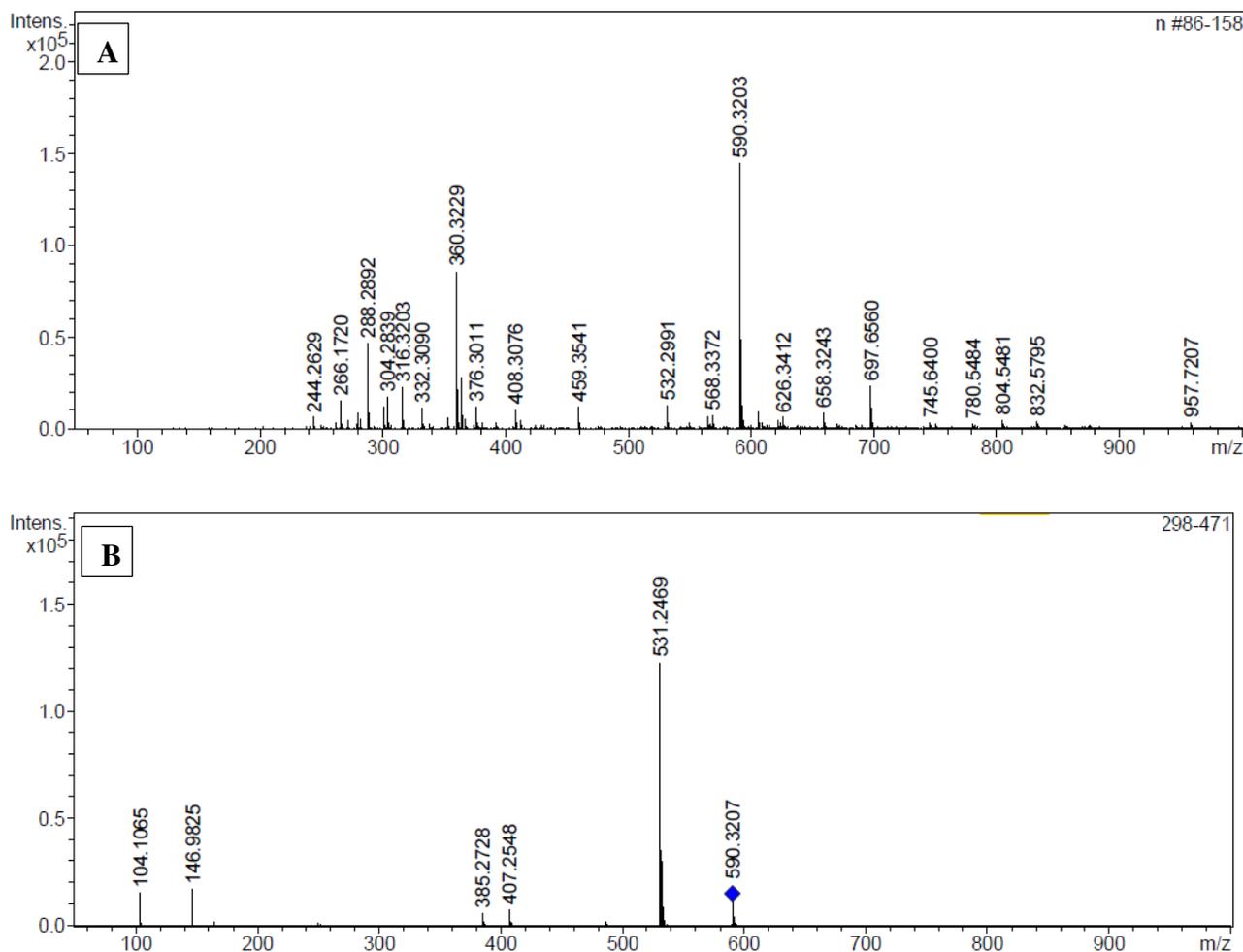


Figure 37 : Spectres ESI-MS (A) et ESI-MS-MS (B) de la LPC DHA, acquisition en mode positif

1.2.4 Suivi de la réaction d'estérification

Afin de suivre le déroulement de la réaction de synthèse de PC DHA-C8 par voie enzymatique, il était nécessaire de développer une méthode analytique permettant de suivre l'évolution de la concentration des produits formés: LPC DHA, LPC C8, PC DHA-C8, PC DHA-DHA, PC C8-C8 ainsi que le substrat restant GPC.

1.2.4.1 Identification des pics

Cette méthode utilise une colonne en phase HILIC. Le gradient développé a pour solvant de l'acétonitrile, du méthanol et une solution d'acétate d'ammonium 10 mM. Cette méthode permet de détecter l'ensemble des molécules produites lors de la synthèse. Cependant, les PC C8-C8 et LPC C8 sont co-éluées et ne sont détectées que par le DEDL. En effet, au même titre que la GPC, elles ne comportent pas de double liaison, ne les rendant pas détectables en UV à 205 nm.

Les phospholipides contenant du DHA sont quant à eux détectables en UV à 205 nm. C'est donc à partir des chromatogrammes UV que vont être quantifiés ces phospholipides. En effet, le nombre important de doubles liaisons portées par le DHA rend toute molécule qui en est composée très sensible à la détection UV à 205 nm. Les chromatogrammes d'un milieu réactionnel de synthèse de PC DHA-C8 sont présentés sur la Figure 38.

En début de chromatogramme, un pic saturé est observé, il correspond aux acides gras libres, soit l'acide caprylique et le DHA. Ils sortent dans le volume mort de la colonne. Etant à des concentrations élevées dans le milieu par rapport aux autres molécules, une quantification est impossible avec la préparation de l'échantillon réalisée. En effet, dans ce travail, la quantification des acides gras en excès n'a pas été étudiée. Néanmoins, une dilution plus importante aurait permis de les quantifier.

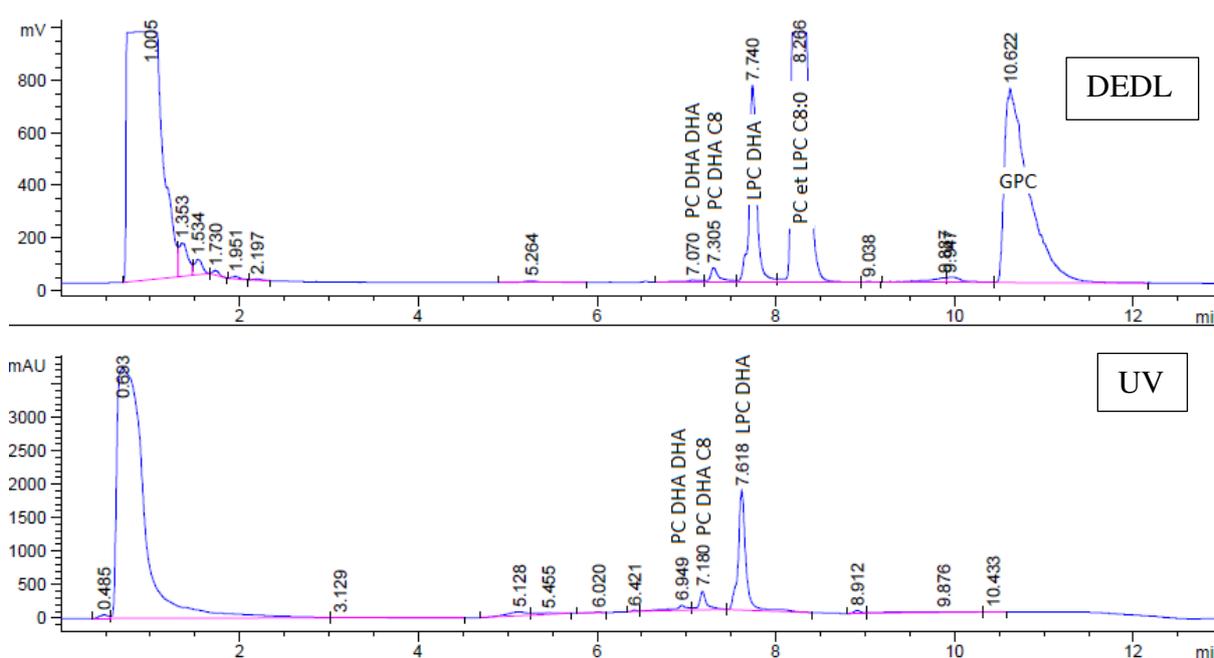


Figure 38 : Chromatogrammes d'un échantillon de synthèse de PC DHA-C8 analysés par HPLC (Colonne HILIC)

1.2.4.2 Quantification des produits néosynthétisés

Des standards des phospholipides néosynthétisés ne sont pas disponibles commercialement ou bien sur commande pour des montants très élevés. Pour quantifier la PC DHA-C8, le détecteur UV est favorisé car il a une réponse linéaire contrairement au DEDL qui a une réponse polynomiale est dépendante de la masse molaire de la molécule étudiée.

L'hypothèse formulée pour permettre la quantification de ces molécules est qu'un phospholipide portant un acide gras présentant une ou plusieurs insaturations et un autre acide

gras saturé aura la même réponse qu'un lysophospholipide portant le même acide gras insaturé. En d'autres termes, la présence d'un acide gras saturé ne fait pas varier la réponse UV. Pour vérifier cette hypothèse des standards disponibles d'1-oléoyl-lysophosphatidylcholine (LPC C18:1) et du 2-oléoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC C18:1-C16:0) ont été analysés et leurs gammes d'étalonnage réalisées (Figure 39).

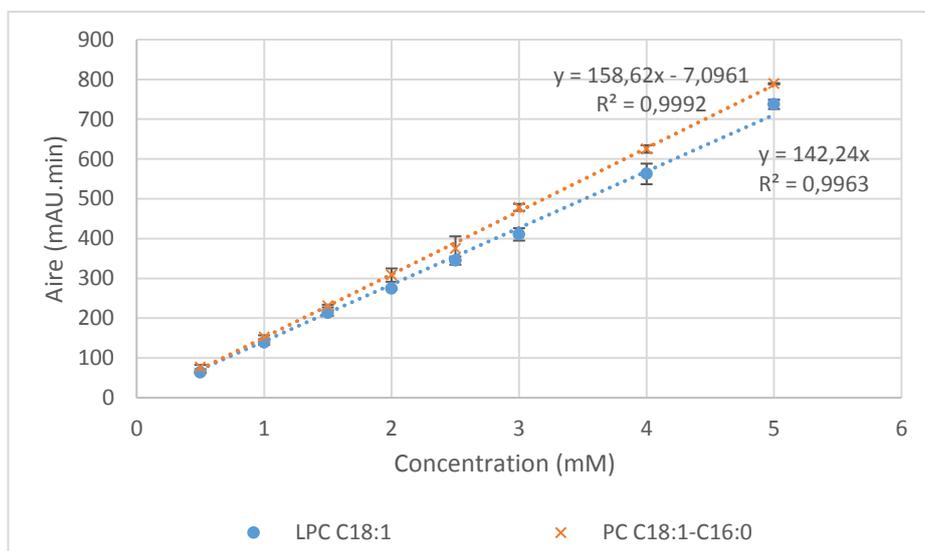


Figure 39 : Gammes d'étalonnage de la LPC C18:1 et la PC C18:1-C16:0 (Les barres d'erreurs représentent les écarts-types de 3 répétitions)

Les pentes trouvées pour les droites de régression (Figure 39) de chacune de ces molécules sont de 142,24 pour la LPC C18:1 et de 156,45 pour la PC C18:1-C16:0. Ces deux valeurs sont proches et présentent une différence de l'ordre de 9%. Ainsi, l'hypothèse est donc vérifiée, le dosage des PC ayant pour acide gras un DHA et un acide gras saturé peut être extrapolé à partir de 1-docosahexaenoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (PC DHA-C18:0), une molécule obtenue dans le commerce. Une gamme d'étalonnage à partir de PC DHA-C8 a été réalisée permettant ainsi par extrapolation la quantification de la PC DHA-C8 et la LPC DHA. En admettant que l'écart de dosage de 9% obtenu entre la LPC C18:1 et la PC C18:1-C16:0 soit le même que pour le dosage des PC contenant un DHA, l'erreur est ici acceptable dans la mesure où nous ne disposons d'aucune alternative pour le dosage de ces molécules.

Un standard de PC DHA-DHA est disponible commercialement, cette molécule est donc directement dosée. Une gamme d'étalonnage a été réalisée (Figure 40).

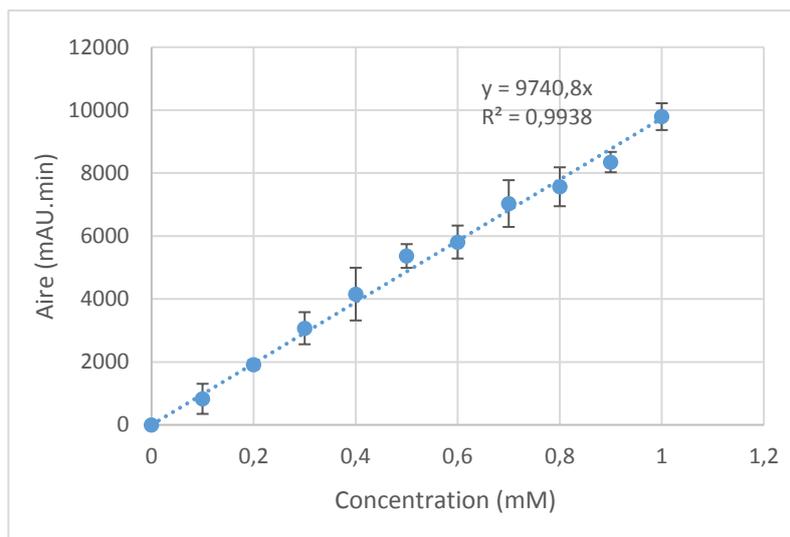


Figure 40 : Gamme d'étalonnage de la PC DHA-DHA. (Les barres d'erreurs représentent les écarts types de 3 répétitions)

2 Traitement de la biomasse

La fraction lipidique d'intérêt issue de la biomasse microalgale est la fraction phospholipidique. Une technique d'extraction permettant de la préserver a été mise au point lors de ce travail. Afin d'optimiser la méthode d'extraction, 4 mélanges de solvants et 2 appareils à ultrasons ont été testés. Enfin, pour déterminer les réglages optimaux de l'appareil à ultrasons, un plan d'expériences a été réalisé, la réponse étudiée étant la quantité de phospholipides extraits.

2.1 Dosage des phospholipides à partir de l'extrait

Afin de vérifier l'efficacité de chaque technique d'extraction, une méthode de dosage des phospholipides a d'abord été mise au point. Deux méthodes colorimétriques de dosage des phospholipides ont été testées. La première méthode permet un dosage des phospholipides par la formation d'un complexe bleu absorbant à 800 nm avec du molybdate d'ammonium. La seconde méthode utilise du ferrothiocyanate d'ammonium qui forme un complexe rouge avec les phospholipides absorbant à 488 nm.

2.1.1 Méthode au molybdate d'ammonium

La première méthode, développée par Mrsny *et al.* [190], consiste à doser les molécules de phosphomolybdate formées entre les atomes de phosphore des phospholipides et du molybdate d'ammonium. Elle n'a pas été retenue car aucune absorbance n'a été observée à la longueur d'onde attendue lors du dosage des phospholipides microalgaux. L'hypothèse formulée pour

expliquer cette observation est que des molécules présentes dans l'extrait lipidique microalgal inhibent la formation de phosphomolybdate. Afin de vérifier cette hypothèse, un extrait microalgal supplémenté en phospholipides de tournesol a été dosé par cette méthode. A l'issue de cette expérience, aucune coloration bleue n'est apparue tandis qu'une gamme réalisée seulement avec des phospholipides de tournesol permet d'obtenir une coloration bleue. Ainsi, l'hypothèse est retenue. Dans l'extrait microalgal, des molécules empêcheraient la formation du complexe phosphomolybdate.

2.1.2 Méthode au ferrothiocyanate d'ammonium

La deuxième méthode, développée par Stewart [191], est basée sur la formation d'un complexe entre le ferrothiocyanate d'ammonium et les phospholipides. Néanmoins, à une longueur d'onde de 488 nm, le spectre d'absorption de l'échantillon microalgal présente une valeur d'absorbance basale liée à la présence de pigments. Ainsi, cette méthode n'est pas très sensible car la détection des phospholipides se fait seulement à partir du moment où la valeur dépasse les 2 mg.mL⁻¹. Cette méthode a été néanmoins utilisée, les échantillons ont été concentrés le cas échéant.

2.2 Extraction

L'extraction des lipides est optimisée. Les lipides totaux sont extraits, cependant, c'est le dosage des phospholipides qui permet de juger de la qualité de l'extraction. En effet, les phospholipides sont les produits que l'on souhaite utiliser dans la suite du travail.

2.2.1 Choix de la méthode d'extraction

Afin d'extraire un maximum de phospholipides, plusieurs solvants ont été testés sur l'extrait microalgal obtenu tel que décrit dans le paragraphe 3.1.1 de la partie Matériels et Méthodes, ainsi que deux appareillages à ultrasons ; un bain à ultrasons et une sonde de sonication. Quatre méthodes standards d'extraction ont été comparées et sont rassemblées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Mélange des solvants utilisés pour l'extraction des lipides microalgaux

Folch <i>et al.</i> [187]	Hara and Radin [186]	Chen <i>et al.</i> [201]	Bligh and Dyer [189]
Méthanol/Chloroforme (1:2)	Isopropanol/Hexane (2:3)	Méthanol/ Dichlorométhane (5:10)	Chloroforme/Méthanol (1:2) puis Chloroforme/Eau (1:1)

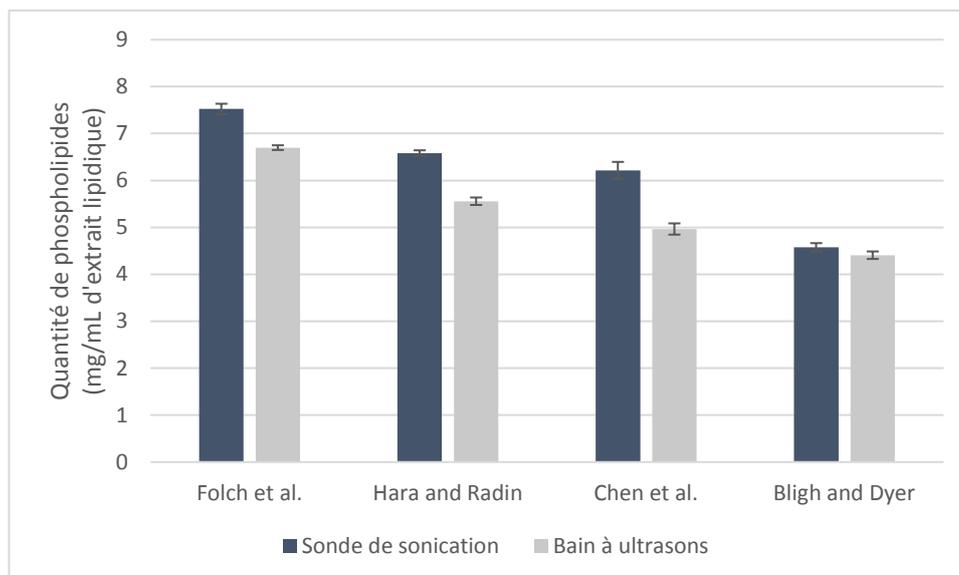


Figure 41 : Comparaison de différents mélanges de solvants et de deux appareillages à ultrasons pour l'extraction des lipides totaux. Le suivi est réalisé par le dosage des phospholipides.

La Figure 41 met en avant que le bain à ultrasons extrait en moyenne 1 mg de phospholipides par mL d'extrait de moins que la sonde de sonication, excepté pour le méthode de Bligh and Dyer, où les quantités extraites sont les mêmes.

La méthode d'extraction de Folch *et al.* avec la sonde de sonication, utilisant du chloroforme et du méthanol est la plus efficace et permet l'extraction de 7,4 mg de phospholipides par mL d'extrait microalgal. Balasubramanian *et al.* [202] ont également démontré dans leurs travaux sur *Nannochloropsis sp.* que le mélange chloroforme/méthanol conduisait à une meilleure extraction des lipides que les autres systèmes de solvants étudiés.

D'autres méthodes d'extraction des lipides présentent un intérêt grandissant comme l'extraction par micro-ondes ou par fluide supercritique. Le fluide supercritique présente une alternative intéressante à l'utilisation de solvants toxiques que sont le chloroforme et le méthanol. Des études portant sur l'extraction des lipides neutres notamment s'intéressent à des solvants dits verts tel que l'éthanol [203]. Ces méthodes n'ont pas été mises en œuvre au sein du laboratoire mais présentent une alternative intéressante pour la suite de ces travaux.

2.2.2 Optimisation de la sonication des extraits lipidiques par la méthodologie de surface de réponse

Afin d'optimiser l'extraction des phospholipides par la méthode de Folch *et al.* à l'aide de la sonde de sonication, un plan d'expériences a été réalisé pour déterminer les réglages de la sonde les plus adaptés à l'extraction des phospholipides de *Tysochrisis lutea*. Le plan d'expériences

réalisé est un plan par méthodologie de surface de réponse. La réponse étudiée est la quantité de phospholipides contenus dans l'extrait lipidique. Les variables de la sonde de sonication étudiées sont l'amplitude (%) (X_2), le temps de sonication (min) (X_1) ainsi que le cycle ($W.s^{-1}$) (X_3). Le Tableau 21 présente la matrice du plan d'expériences réalisé.

Tableau 21 : Matrice du plan d'expériences réalisé et résultats expérimentaux

Expériences	Facteurs			Réponse (Y)
	Temps (min), X_1	Amplitude (%), X_2	Cycle (W/s), X_3	Quantité de phospholipides (mg/ml)
1	15 (-1)	32 (-1)	0,3 (-1)	7,242
2	25 (+1)	32 (-1)	0,3 (-1)	2,775
3	15 (-1)	68 (+1)	0,3 (-1)	5,700
4	25 (+1)	68 (+1)	0,3 (-1)	3,308
5	15 (-1)	32 (-1)	0,7 (+1)	6,266
6	25 (+1)	32 (-1)	0,7 (+1)	3,666
7	15 (-1)	68 (+1)	0,7 (+1)	4,442
8	25 (+1)	68 (+1)	0,7 (+1)	3,216
9	11,59 (- α)	50 (0)	0,5 (0)	5,725
10	28,41 (+ α)	50 (0)	0,5 (0)	2,525
11	20 (0)	20 (- α)	0,5 (0)	4,066
12	20 (0)	80 (+ α)	0,5 (0)	4,958
13	20 (0)	50 (0)	0,2 (- α)	5,916
14	20 (0)	50 (0)	0,8 (+ α)	4,650
15	20 (0)	50 (0)	0,5 (0)	5,300
16	20 (0)	50 (0)	0,5 (0)	5,150
17	20 (0)	50 (0)	0,5 (0)	5,183
18	20 (0)	50 (0)	0,5 (0)	5,358
19	20 (0)	50 (0)	0,5 (0)	6,608
20	20 (0)	50 (0)	0,5 (0)	5,525

Les données obtenues à partir du plan composite central ont conduit à une équation polynomiale du second degré décrite ci-dessous :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1-1} X_1^2 + \beta_{2-2} X_2^2 + \beta_{3-3} X_3^2 + \beta_{1-2} X_1 X_2 + \beta_{1-3} X_1 X_3 + \beta_{2-3} X_2 X_3$$

avec β = Coefficient

X = Facteurs ou variables

Dans le Tableau 22, la signification statistique de chaque coefficient du modèle est donnée. La p-value est la probabilité qu'un coefficient soit négligeable. Ce tableau met en évidence que les deux termes quadratiques β_1^2 et β_2^2 , le terme linéaire β_1 ainsi que la constante β_0 sont significatifs car leur p-value est inférieure à 0,05, tandis que les autres termes ne le sont pas (p-value > 0,05).

Tableau 22 : Coefficients du modèle

Coefficients du modèle	Estimation des paramètres	Erreur standard	p-value
β_0	5,521	0,248	<0,0001
β_1	-1,176	0,165	<0,0001
β_2	-0,131	0,165	0,466
β_3	-0,261	0,165	0,144
β_{1-1}	-0,495	0,16	0,011
β_{2-2}	-0,359	0,16	0,049
β_{3-3}	-0,086	0,16	0,603
β_{1-2}	0,431	0,215	0,073
β_{1-3}	0,379	0,215	0,108
β_{2-3}	-0,158	0,215	0,478

Le Tableau 22 peut être représenté sous forme de diagramme à barres (Figure 42). L'influence des facteurs et de leurs interactions est évaluée par l'intermédiaire des coefficients du modèle postulé. Il faut donc trouver une valeur étalon pour juger de l'importance d'un coefficient. Cet étalon sera l'écart-type du coefficient. Ainsi, la valeur du coefficient est comparée à la valeur de son écart-type. Si le coefficient est nettement plus grand que son écart-type, alors le coefficient est influent. Si le coefficient est nettement plus petit que son écart-type, ce coefficient peut être éliminé. Si le coefficient est du même ordre de grandeur que son écart-type, il faut faire appel aux connaissances du phénomène et aux enjeux de l'étude pour prendre une décision.

Ainsi, ce type de diagramme nous apprend si les facteurs et les interactions entre les facteurs sont significatifs. Lorsque les barres d'erreurs enjambent le 0, c'est que le facteur représenté

par la barre n'est pas significatif. Une deuxième information peut être lue sur cette représentation : les diagrammes représentent les valeurs des coefficients. Ainsi, l'effet moyen du facteur temps est négatif, cela signifie que la réponse a tendance à diminuer quand le facteur passe du niveau bas au niveau haut. Ainsi, l'augmentation de la durée de sonication tend vers un effet négatif sur la quantité de phospholipides extraits, il faut rappeler que ceci est vrai dans le domaine étudié soit pour la durée de sonication entre 12 et 28 min.

L'influence des autres facteurs et interactions sur l'extraction des phospholipides est, quant à elle non significative car les barres d'erreurs enjambent le 0. Afin d'améliorer le modèle, les termes dont la p-value est la plus élevée peuvent être éliminés du modèle un à un permettant l'obtention d'un sous modèle dont l'analyse de la variance est satisfaisante.

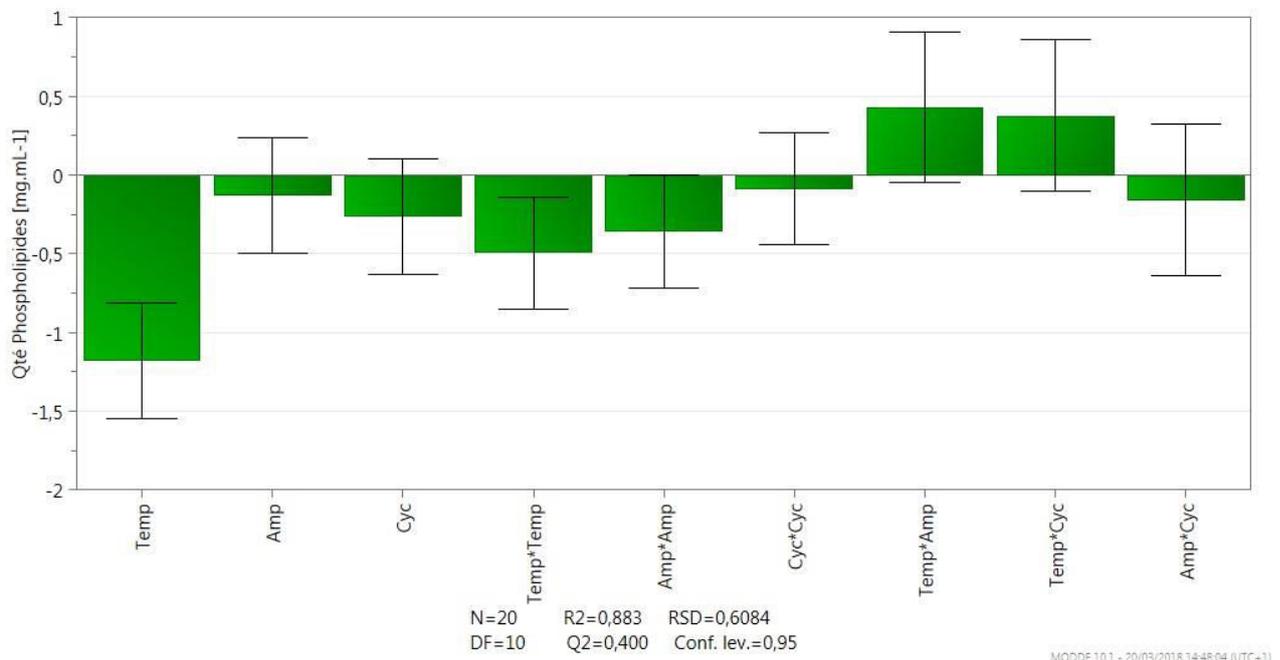


Figure 42 : Coefficients du modèle

Le plan d'expériences a donc été amélioré en un sous-modèle permettant d'obtenir une nouvelle équation dont la forme est

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1-1} X_1^2 + \beta_{2-2} X_2^2 + \beta_{1-2} X_1 X_2 + \beta_{1-3} X_1 X_3$$

Certaines variables non significatives ont été maintenues dans le nouveau modèle car un terme quadratique (β_2^2) contenant cette variable β_2 est significatif ($p < 0,05$).

D'après la lecture des résultats, seul le temps de sonication ayant un effet important sur la réponse semble être à considérer pour cette extraction, ainsi que son effet quadratique (temps x

temps). Ainsi, la durée de sonication est le facteur le plus influant sur l'extraction des phospholipides

Tableau 23 : Coefficients du sous-modèle

Coefficients du modèle	Estimation des paramètres	Erreur standard	p-value
β_0	5,451	0,200	<0,0001
β_1	-1,176	0,156	<0,0001
β_2	-0,131	0,156	0,420
β_3	-0,261	0,156	0,121
β_{1-1}	-0,487	0,151	0,007
β_{2-2}	-0,350	0,151	0,039
β_{1-2}	0,431	0,204	0,056
β_{1-3}	0,379	0,204	0,088

Pour finir l'analyse du plan d'expériences, il est nécessaire de s'assurer de la qualité prédictive de ce modèle ainsi que de sa qualité descriptive en utilisant les outils statistiques (Figure 43). Le Q^2 traduit la qualité prédictive d'un modèle. Un Q^2 supérieur à 0,5 est considéré comme correct. Le R^2 permet de juger de la qualité descriptive du modèle, ainsi, plus la valeur de régression est proche de 1 et plus la qualité descriptive du modèle est satisfaisante. Dans cette étude, le R^2 de 0,88 montre que le modèle est descriptif.

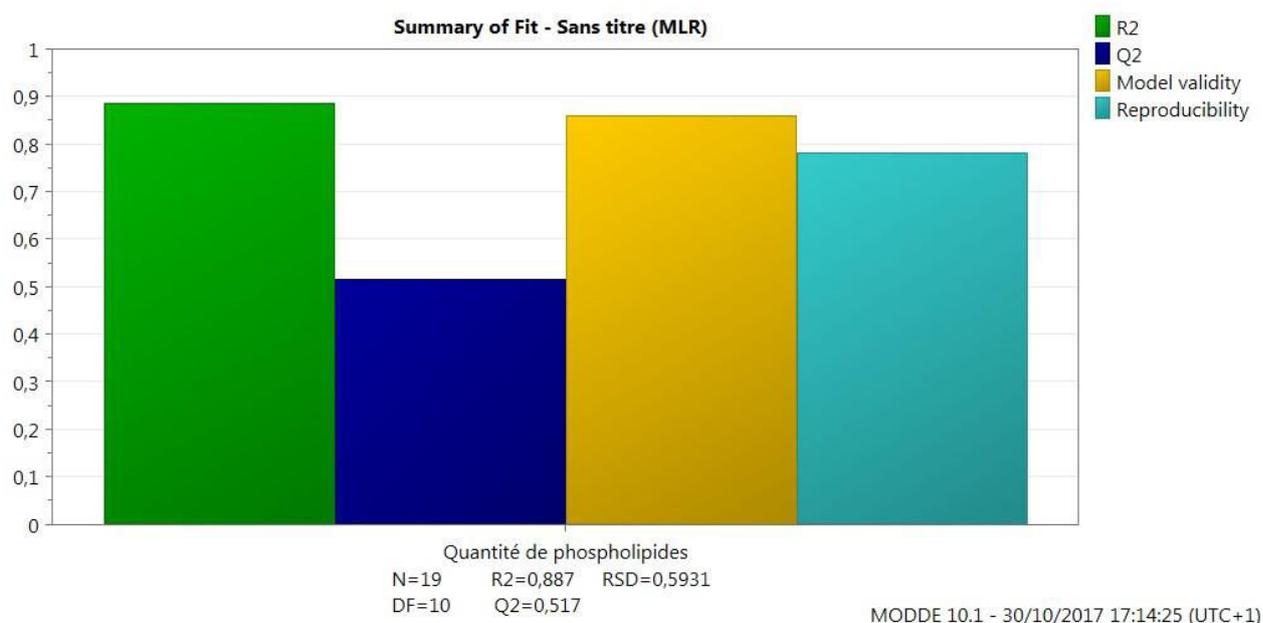


Figure 43 : Qualité descriptive et prédictive du modèle

2.2.3 Analyse du plan d'expériences à surface de réponse et détermination des facteurs optimaux d'extraction de phospholipides microalgaux

Les surfaces de réponses sont une représentation graphique où chaque point du domaine correspond à une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse. Dans le cas présent, l'exploitation du modèle est réalisée par une lecture des courbes d'isoréponses (Figure 44) qui constituent une projection de la surface de réponse dans le plan horizontal. Elles s'interprètent comme les courbes de niveaux, dessinées sur une carte topographique. Cette représentation ne fait intervenir que 2 facteurs à la fois, le troisième étant fixé. Une échelle colorimétrique relate les quantités de phospholipides extraits selon les paramètres étudiés.

L'exécution du modèle par le logiciel MODDE livre que l'extraction des phospholipides est maximale pour une durée de sonication de 15 min, une amplitude de 35% et un cycle réglé sur $0,3 \text{ W}\cdot\text{s}^{-1}$.

Un plan composite centré a été réalisé par Chua *et al.* [204] pour étudier l'effet des différents paramètres de la sonde de sonication sur l'extraction des phospholipides à partir des fibres de palmier pressées. Les résultats de cette étude montrent que la quantité de phospholipides extraits augmente avec des temps de sonication d'une durée minimale de 30 min. Concernant les autres réglages, ils préconisent un cycle réglé sur $0,3 \text{ W}\cdot\text{s}^{-1}$ et une amplitude de 20%. Ces résultats sont différents de ceux observés pour l'extraction des phospholipides microalgaux ; cela est probablement dû aux caractéristiques structurelles de la microalgue qui ne comporte pas de paroi cellulaire rigide contrairement aux fibres de palmier. Ainsi, la rupture cellulaire de *Tisochrysis lutea* ne nécessite pas un temps de sonication très élevé pour déstructurer les membranes et libérer les phospholipides. Une augmentation du temps de sonication tend à diminuer la quantité de phospholipides dosés dans l'extrait. Ceci peut être dû à une dégradation de ceux-ci.

Les résultats obtenus en termes de quantité de phospholipides extraits sont difficilement comparables à la littérature. En effet, le plus souvent les extractions sont réalisées à partir d'une biomasse sèche. L'absence de lyophilisateur au laboratoire n'a pas permis la réalisation de cette manipulation sur biomasse sèche.

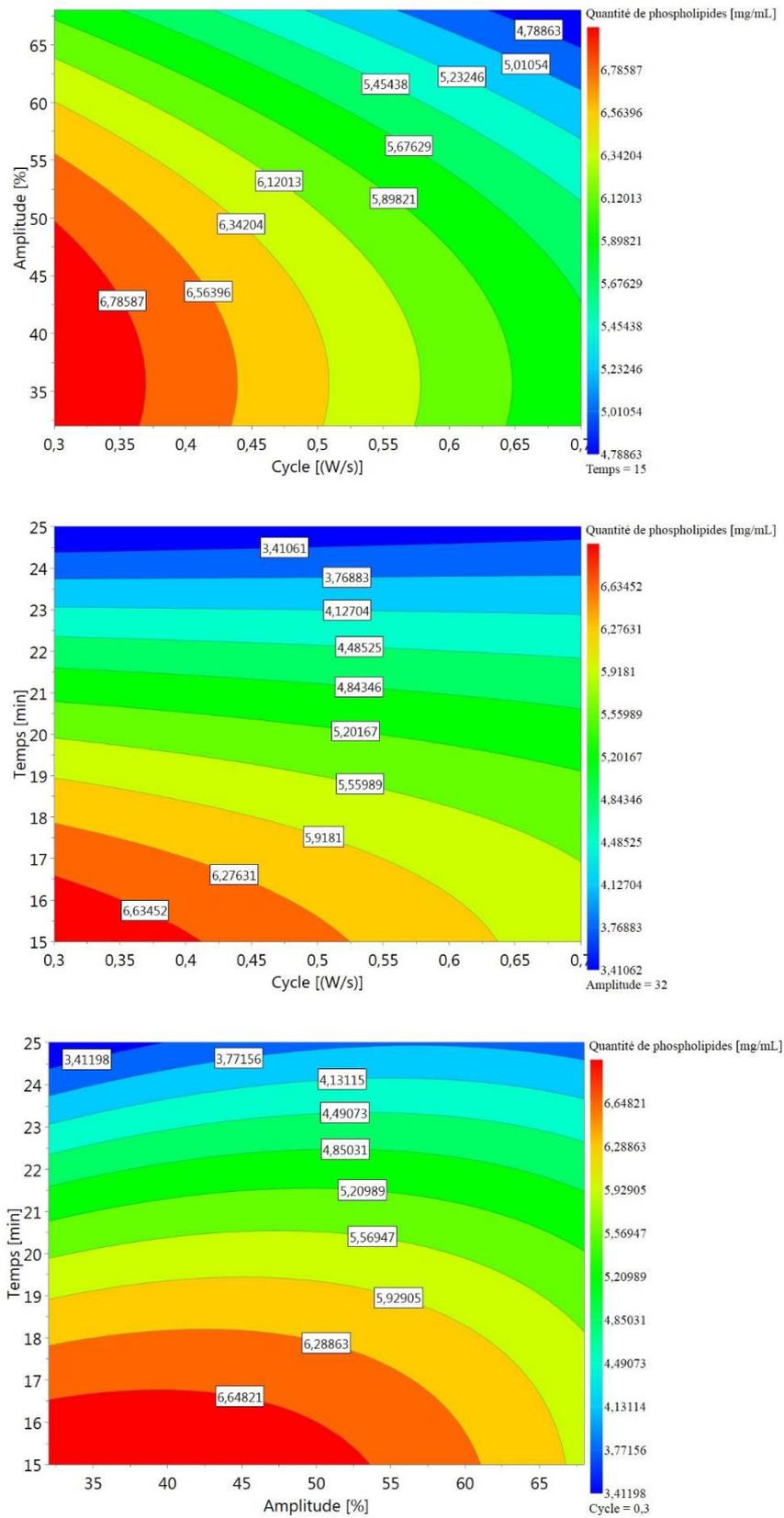


Figure 44 : Courbes d'isoréponses de la quantité de phospholipides extraits en fonction des interactions entre les facteurs.

Une manipulation de confirmation a été réalisée pour valider le modèle avec une amplitude de 35%, un cycle de 0,3 W.s⁻¹ et une durée de sonication de 15 min. La quantité de phospholipides extrait lors de cette expérience est de 7,05mg.mL⁻¹. Le modèle prévoit, pour les conditions d'extraction optimisées, une quantité de phospholipides extraite de 6,65 mg.mL⁻¹. La valeur obtenue est légèrement supérieure à celle attendue et présente une variabilité de 6%, qui est acceptable. Le modèle est validé.

2.3 Répartition du DHA entre les classes de lipides

La composition en acides gras ainsi que leur répartition au sein des lipides de *Tisochrysis lutea* a été réalisée afin de s'assurer de la présence du DHA en grande quantité sur les phospholipides comme cela est observé chez la microalgue *Isochrysis galbana* [76].

2.3.1 Séparation des classes de lipides de *Tisochrysis lutea*

La séparation des classes de lipides a été réalisée à l'aide d'une chromatographie basse pression sur gel de silice. Trois solvants successifs ont été utilisés, chaque solvant étant spécifique d'une classe de lipides. Ainsi, le dichlorométhane permet l'élution des lipides neutres, l'acétone permet l'élution des glycolipides et enfin, le méthanol élue les phospholipides.

La répartition des classes de lipides de *Tisochrysis lutea* est obtenue par pesée (partie Matériels et Méthodes paragraphe 3.3). Les lipides neutres sont largement majoritaires et retrouvés à hauteur de 57,8%. Les glycolipides sont retrouvés à hauteur de 33,8%. Les phospholipides sont les plus faiblement représentés (8,5%).

Ces résultats sont conformes aux données retrouvées dans l'article de Nalder *et al.* [77] qui ont étudié la répartition des classes de lipides selon le stade de développement de la microalgue. Cette étude met en avant que les phospholipides sont en quantité plus élevées durant la phase de latence et la phase exponentielle (15%), quantité qui se stabilise autour de 10 % en fin de phase exponentielle et durant la phase stationnaire au profit des lipides neutres. En effet, les triglycérides sont les lipides de réserve de la microalgue.

La composition des diverses fractions des lipides microalgaux de *Tisochrysis lutea* a été largement étudiée dans la littérature. Ainsi, au sein des lipides neutres sont retrouvés les stérols, les triglycérides ainsi que les pigments. Les principaux pigments présents chez *Tisochrysis lutea* sont les chlorophylles a ainsi que les fucoxanthines. Des diadionxanthines et de la chlorophylle c sont également retrouvées mais en très faibles quantités [205]. Le stérol majoritaire, le

brassicastérol, représente 96% des stérols chez *Tisochrysis lutea* [206]. Dans les lipides neutres, des traces d'acides gras libres peuvent être retrouvées, néanmoins, le fait d'ébouillanter la biomasse permet de limiter l'hydrolyse des lipides.

Parmi les glycolipides, des monogalactosyl monoacylglycérols, des monogalactosyl diacylglycérols, des digalactosyl monoacylglycérols et des digalactosyl diacylglycérols sont présents [207]. Des sulfoquinovosyldiacylglycérides, composés présentant une activité anti-tumorale et antivirale sont également présents [208].

2.3.2 Profil en acides gras des lipides de *Tisochrysis lutea*

La composition en acides gras des lipides totaux, lipides neutres, glycolipides et phospholipides est déterminée afin de connaître leur répartition des acides gras, en particulier celle du DHA, au sein des trois classes de lipides.

La Figure 45 montre le profil en acides gras obtenus par CPG de la souche *Tisochrysis lutea*. Dans les lipides totaux, 7 acides gras sont représentés comprenant entre 14 et 22 carbones. Les deux acides gras principaux sont l'acide myristique (C14:0) (16%) et l'acide linoléique (C18:2) (13,7%).

Il est intéressant de regarder la composition en acides gras selon les classes de lipides. Les acides gras majoritaires dans la classe des lipides neutres sont l'acide myristique (C14:0) (9,8%), l'acide palmitique (C16:0) (10,7%), l'acide oléique (C18:1) (12,1%) et l'acide linoléique (C18:2) (20%). L'acide linoléique (C18:3 ω 3) représente seulement 8,5% des acides gras. Enfin, le DHA (C22:6) représente 7,2% des acides gras.

Pour la classe des glycolipides, l'acide gras majoritaire est l'acide linoléique (C18:2) (22,5%). Les autres acides gras prédominants de cette classe sont des acides gras saturés, l'acide myristique (C14:0) (15,8%) et l'acide palmitique (C16:0) (12,4%).

Enfin, dans la classe des phospholipides, le DHA (C22:6) est le plus représenté avec un pourcentage de 45,2%. Les autres acides gras de cette classe sont l'acide myristique (C14:0) (19,4%) et de l'acide oléique (C18:1) (9,2%). Le profil en acides gras des phospholipides de *Tisochrysis lutea* est donc assez simple puisque 74% des acides gras sont représentés par ces 3 acides gras majoritaires. Cette classe est très riche en ω 3, principalement représentés par le DHA.

La répartition du DHA total au sein des 3 classes de lipides est très inégale. En effet, plus de 43,5% de la quantité totale de DHA est localisé dans les phospholipides. Les glycolipides, quant à eux, ne contiennent que 3,3% de DHA soit 2 fois moins que les lipides neutres (6,7%). Ces résultats sont conformes à l'étude menée par Nalder et al [77]. Il est important de préciser que malgré la forte proportion en DHA des phospholipides, ceux-ci représentent moins de 10% des lipides extraits.

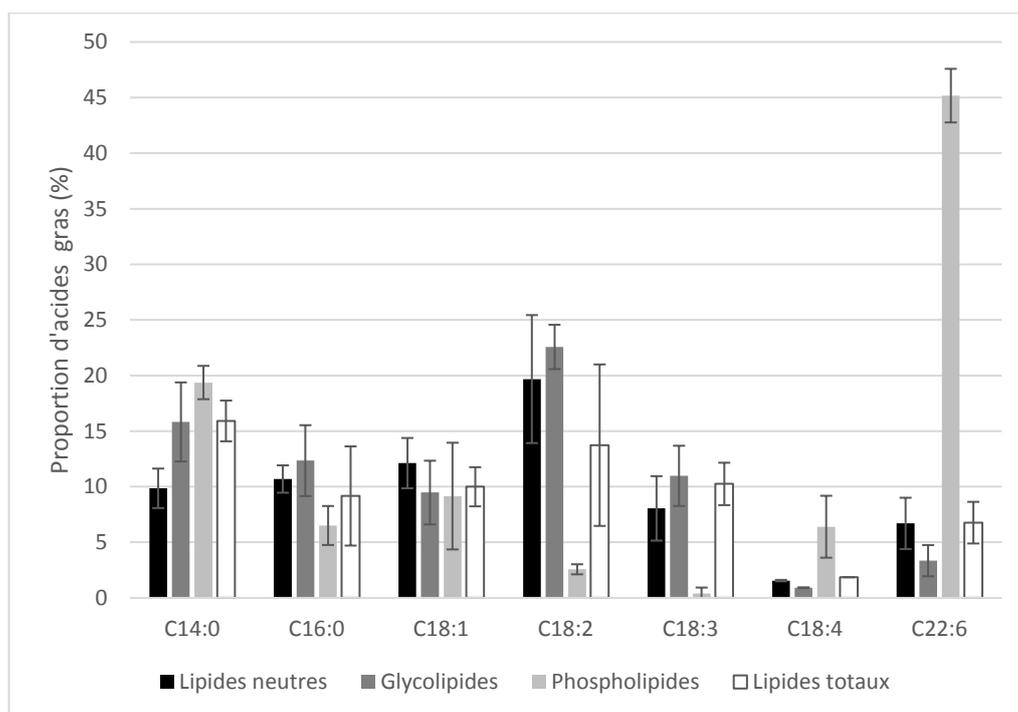


Figure 45 : Profil en acides gras des lipides totaux et des trois classes de lipides de *Tisochrysis lutea*

Un autre fait intéressant est l'absence d'EPA dans la composition en acides gras de *Tisochrysis lutea*. En effet, le plus souvent les microalgues synthétisent ces deux acides gras comme exposé sur le Tableau 2 (partie I chapitre 1.7.3). Seules quelques espèces ne synthétisent que du DHA comme *Amphidinium sp.* et *Cryptocodinium cohnii*. Selon les conditions de culture, la microalgue *Isochrysis galbana* présente la même caractéristique [69].

En conclusion, l'analyse du profil en acides gras des lipides de *Tisochrysis lutea* a montré que le DHA est largement représenté au sein des phospholipides. Cette large proportion en DHA au sein des phospholipides en font donc un excellent substrat pour l'obtention de PC DHA-C8 par acidolyse.

3 Synthèse enzymatique de phospholipides structurés

Dans ce travail, il s'agit d'obtenir par génie enzymatique des phosphatidylcholines portant un DHA et un acide caprylique. Comme exposé dans les objectifs de la thèse (Partie I, paragraphe 4), deux réactions enzymatiques sont étudiées :

- L'acidolyse par de l'acide caprylique de phospholipides microalgaux de *Tisochrysis lutea* riches en DHA
- L'estérification de GPC par de l'acide caprylique et du DHA

La réaction d'acidolyse a tout d'abord été optimisée avec de la PC de tournesol car la phosphatidylcholine de la microalgue *Tisochrysis lutea* est un substrat onéreux et nécessitant des étapes d'extraction et de purification préalables. Les phosphatidylcholines de tournesol sont obtenues auprès de Lipoid (Ludwigshafen, Allemagne).

3.1 Acidolyse des phosphatidylcholines de tournesol

Les phosphatidylcholines de tournesol sont principalement composées d'acide linoléique. La réaction permettant l'obtention de PC C18:2-C8 est représentée sur la Figure 46. Sur cette figure les coproduits possibles de la réaction ne sont pas représentés.

Afin d'optimiser cette réaction, un plan d'expériences a été réalisé. La mise en place d'un plan d'expériences se fait en deux étapes, la première étape consistant à tester les facteurs influant sur la réaction et d'en déterminer les limites ou bornes afin de définir le domaine expérimental. La deuxième étape consiste en la réalisation de ce plan d'expériences et en sa modélisation à l'aide du logiciel Modde.

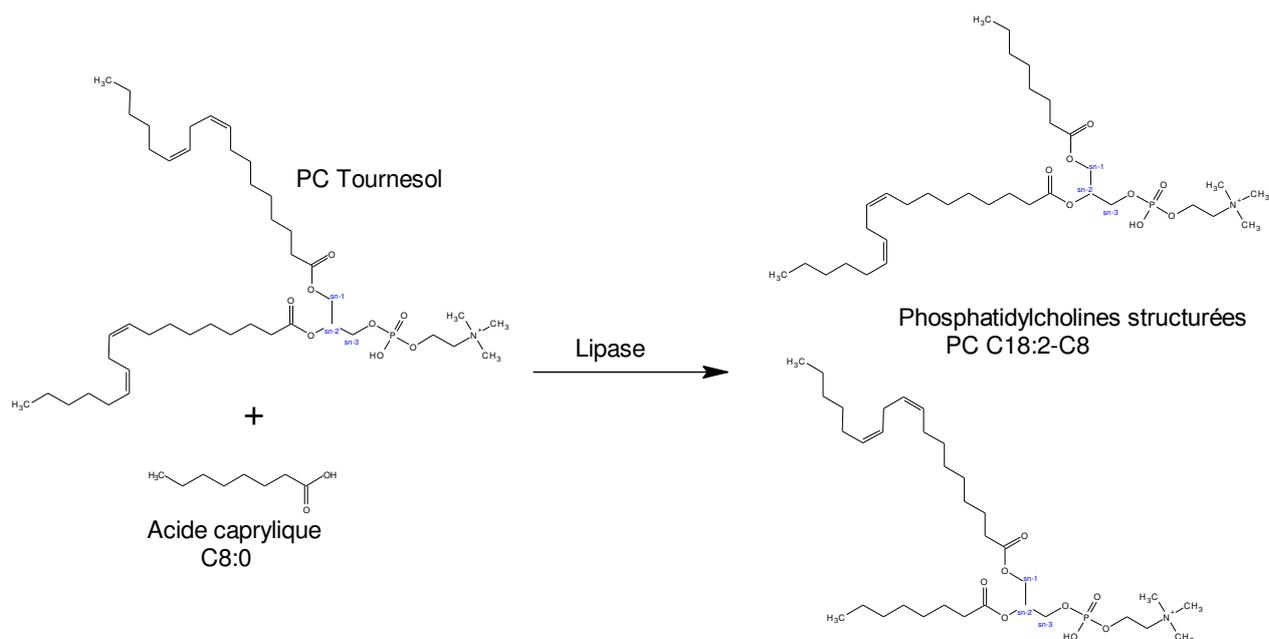


Figure 46 : Réaction d'acidolyse entre de l'acide caprylique et des PC de tournesol

3.1.1 Faisabilité de la réaction et choix de l'enzyme

Il est nécessaire de vérifier la faisabilité de la réaction avant la réalisation d'un plan d'expériences. Cette faisabilité a été étudiée avec 6 lipases commerciales : RM-IM, TL-IM, Novozym 435, Novozym 40086 et PS-IM et la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur terre de diatomée. Toutes ces enzymes présentent une régiosélectivité 1-3 [209].

Les réactions d'acidolyse sont réalisées en milieu fondu, c'est-à-dire sans ajout de solvants. En général, l'activité catalytique d'une enzyme est déterminée par hydrolyse d'un substrat de référence. Toutefois, il n'y a pas de ressemblance entre les milieux réactionnels d'une hydrolyse et d'une acidolyse donc l'activité dans les 2 réactions peut être très différente.

La Figure 47 présente les vitesses initiales (A) et les cinétiques (B) obtenues pour les 4 enzymes ayant été en capacité de réaliser une acidolyse. La lipase issue de *Pseudomonas cepacia* n'a pas démontré de capacité à réaliser cette acidolyse et ce, malgré deux supports d'immobilisation différents, à savoir, de la terre de diatomée ou de la résine Immobead 150. Les activités enzymatiques de Novozym 435, RM-IM et Novozym 40086 sont assez proches avec des vitesses initiales comprises entre 1,3 et 1,8 mAU. La lipase TL-IM se démarque largement avec une vitesse initiale aux alentours de 10,4 mAU. En termes de plateaux des cinétiques, les observations faites au niveau des vitesses initiales se confirment. En effet, TL-IM permet d'atteindre un plateau à 30 h tandis que les autres atteignent un plateau très faible, de 2000

mAU.min (Novozym 435 et Novozym 40086). RM-IM en 54h n'a pas atteint le plateau et atteint 6000 mAU.min. La phase stationnaire avec la lipase TL-IM atteint 12000 mAU.min. Ainsi la lipase TL-IM est deux fois plus efficace dans la réalisation de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique que la lipase RM-IM.

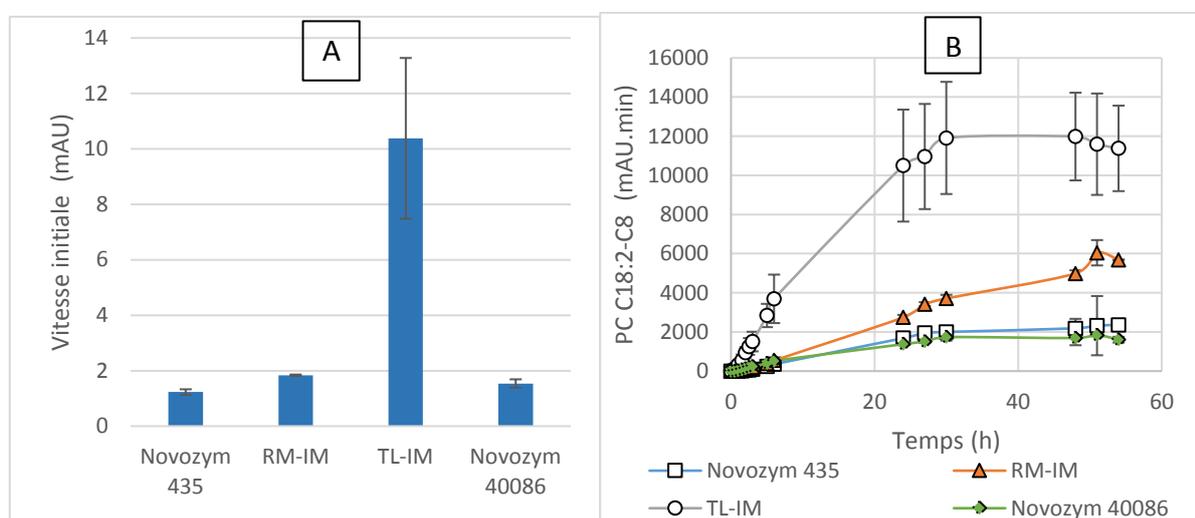


Figure 47 : Vitesses initiales (A) et cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique catalysée par 4 lipases commerciales. (45°C, ratio C8:0/PC=6, 150 mg d'enzyme, $a_w=0,5$)

Comme montré précédemment dans le Tableau 9 (partie I, paragraphe 3.3.2.3), les lipases Novozym 435, RM-IM et TL-IM sont le plus souvent utilisées pour réaliser ce type de réaction. Il y a pour l'instant très peu de renseignements dans la littérature concernant la lipase Novozym 40086. La lipase issue de *Pseudomonas cepacia* n'est pas mentionnée dans de précédentes études pour sa capacité à réaliser des réactions d'acidolyse. Il n'est donc pas étonnant de ne pas lui trouver d'activité pour la réaction étudiée. Pour la suite de l'étude, la lipase TL-IM est retenue.

La lipase de *Rhizomucor miehei* est dans cette étude immobiliser sur 2 supports différents, à savoir l'immobead 150 (Novozym 40086) et une résine échangeuse d'anions (RM-IM). En termes de vitesses initiales de réaction, le support initial n'influe pas sur la réaction. Cependant en termes de plateaux des cinétiques, la lipase immobilisée sur la résine échangeuse d'anions permet de doubler la quantité de PC C18 :2-C8 formée.

3.1.2 Mise en place du plan d'expériences : définition des facteurs et du domaine expérimental

Un plan d'expériences a été réalisé afin de déterminer les niveaux optimaux des facteurs de la réaction d'acidolyse. Dans un premier temps, il a été nécessaire de définir les différents facteurs

ainsi que le domaine expérimental. Enfin, un plan factoriel complet a été réalisé et son analyse statistique réalisée.

La méthode des plans d'expériences permet de déterminer une relation entre deux types de grandeurs, la réponse et les facteurs. Le choix du nombre et de l'emplacement des points d'expériences est le problème fondamental des plans d'expériences. On cherche à réaliser le minimum d'expériences tout en réduisant l'influence de l'erreur expérimentale sur les modélisations mathématiques qui serviront à prendre des décisions. Cet objectif est atteint lorsque les propriétés mathématiques et statistiques qui relient la réponse aux facteurs sont considérées.

Dans le cas présent, la mise en œuvre du plan d'expériences permet de calculer les variations de la réponse en fonction des facteurs et interactions qui auront été préalablement jugés influents. Les plans d'expériences par méthodologie de surface de réponse permettent de déterminer comment la réponse varie.

Deux réponses sont étudiées dans le cadre de l'acidolyse des phosphatidylcholines de tournesol par l'acide caprylique à savoir la vitesse initiale de la production de PC C18:2-C8, et la quantité de PC C18:2-C8 produite. Il est important que les réponses soient quantitatives afin de permettre l'utilisation de méthodes d'analyses statistiques telles que l'analyse de la variance ou de régression dont les hypothèses sont généralement admises (homogénéité des variances des données et normalité des mesures) lors de la mise en œuvre d'un plan d'expériences.

L'étape dite de « bornage » permet de déterminer les facteurs influents ainsi que leurs différents niveaux. Cette étape permet de définir le domaine expérimental. Elle consiste en l'identification des différents facteurs pouvant avoir une influence sur la réponse. A l'issue de cette étape, il peut être décidé d'enlever des facteurs dont la variation de la réponse est faible dans l'intervalle d'étude considéré. La suite du travail s'intéresse à la définition des facteurs influents et à déterminer leur niveau : c'est le bornage.

3.1.2.1 [Quantité d'enzyme](#)

La quantité d'enzyme a été étudiée dans le cadre du bornage du plan d'expériences. En théorie, plus il y a d'enzyme dans le milieu réactionnel, plus la vitesse initiale est importante. Dans le cadre de milieu non conventionnel et en présence d'enzyme immobilisée, la réaction enzymatique peut être ralentie par une quantité d'enzyme trop importante. En effet, une bonne agitation est nécessaire au bon déroulement de la réaction. Or, les enzymes immobilisées ne

favorisent pas le transfert de masse entre le substrat et l'enzyme, ainsi un excès d'enzyme peut limiter le bon déroulement de la réaction.

Dans le cas présent, 4 quantités d'enzymes ont été étudiées : 50, 100, 150 et 200 mg pour une masse en substrat de 1 g. D'après la Figure 48, il y a proportionnalité entre les quantités d'enzyme et les vitesses initiales obtenues. Ceci est conforme à la théorie. L'équilibre est atteint à 27 heures pour les quantités d'enzymes de 200 et 150 mg. Pour les faibles quantités d'enzyme (50 et 100 mg), l'équilibre n'est pas atteint en 72h.

Dans le cas présent, c'est une quantité de 150 mg d'enzyme qui va être retenue pour la suite du plan d'expériences car au-delà de cette quantité, il est difficile de réaliser les prélèvements au cours de la réaction. En effet, une trop forte quantité d'enzyme rend le milieu très visqueux et il y a adsorption du milieu réactionnel sur le support enzymatique. C'est d'ailleurs pour cela qu'aucun résultat avec une quantité d'enzyme supérieure à 200 mg n'est présenté.

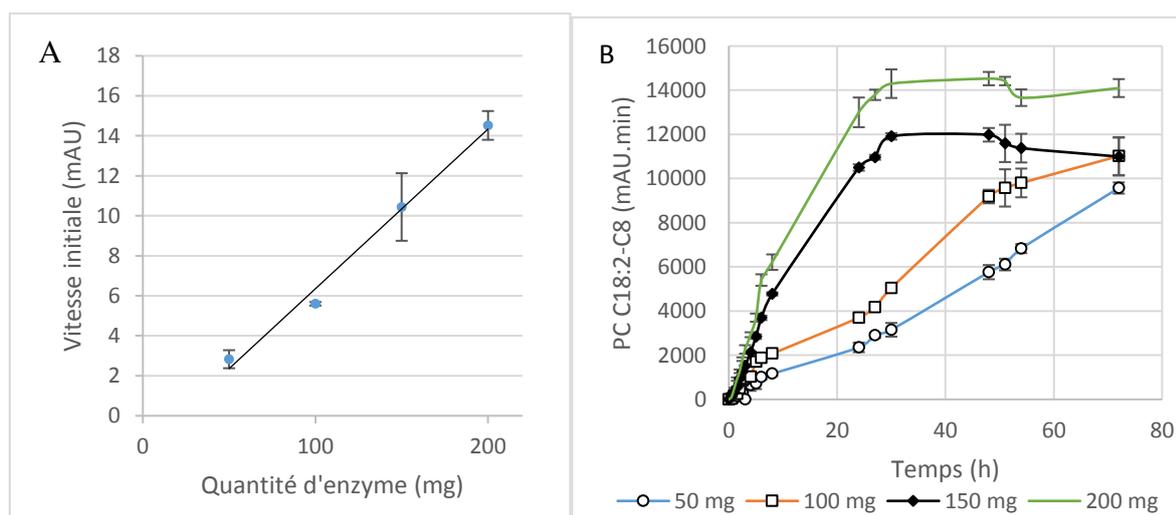


Figure 48 : Etude de la quantité d'enzyme sur la vitesse initiale (A) et les cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique (TL-IM, 45°C, C8:0/PC=6, aw=0,5)

3.1.2.2 Effet du rapport molaire

Afin de continuer à borner le domaine d'expériences, plusieurs cinétiques ont été réalisées en faisant varier le rapport molaire C8:0/PC entre 3 et 24. Le tracé des courbes de l'aire de PC C18:2-C8 en fonction du temps selon les différents rapports molaires (3 ; 6 ; 12 ; 18 ; 24) a permis de déterminer les vitesses initiales. La Figure 49 A présente les vitesses initiales en fonction des différents rapports molaires. Pour l'ensemble des rapports molaires étudiés, la vitesse initiale est stable autour de 9 mAU. Il n'y a donc pas d'effet significatif du rapport molaire sur la vitesse initiale.

La Figure 49 B présente les cinétiques. Une quantité trop faible d'acide caprylique dans le milieu limite le rendement de la réaction. Pour tous les rapports molaires étudiés, l'équilibre de la réaction est atteint en 24 h. Cependant, la quantité de PC C18:2-C8 est la plus élevée pour les rapports molaires de 6, 18 et 24. Les faibles quantités en PC C18:2-C8 obtenues pour un rapport molaire de 3 peuvent être liées à une agitation plus limitée du mélange réactionnel. En effet, une réduction de la quantité d'acide caprylique conduit à un milieu plus visqueux limitant les échanges entre les enzymes et leurs substrats. L'acide caprylique, dans le cadre d'une réaction menée dans un milieu non conventionnel, joue le rôle de solvant en même temps qu'il est substrat de la réaction.

Il a été décidé pour la réalisation du plan d'expériences de fixer le rapport molaire à 18, ce rapport molaire permettant d'atteindre un rendement maximal sans augmenter davantage la quantité d'acide caprylique. En effet, en vue de purifier les produits, l'excès d'acide caprylique peut poser problème. De plus, cela complique l'analyse par HPLC, l'acide caprylique dilue la phosphatidylcholine dans l'échantillon. Ainsi, pour une analyse en HPLC, la détection est plus faible car dans le cas d'un rapport molaire de 18, la PC de tournesol est alors diluée 18 fois. Ainsi, si le rapport molaire est trop élevé, il devient difficile de détecter le produit d'intérêt, la PC C18:2-C8, notamment en début de réaction, lorsqu'il est faiblement concentré. Pour réaliser une analyse en HPLC, il est indispensable de diluer l'échantillon dans le solvant d'éluion. Le rapport molaire de 6 a été écarté car la viscosité du milieu est plus importante qu'avec un rapport molaire de 18 et complique la pratique expérimentale.

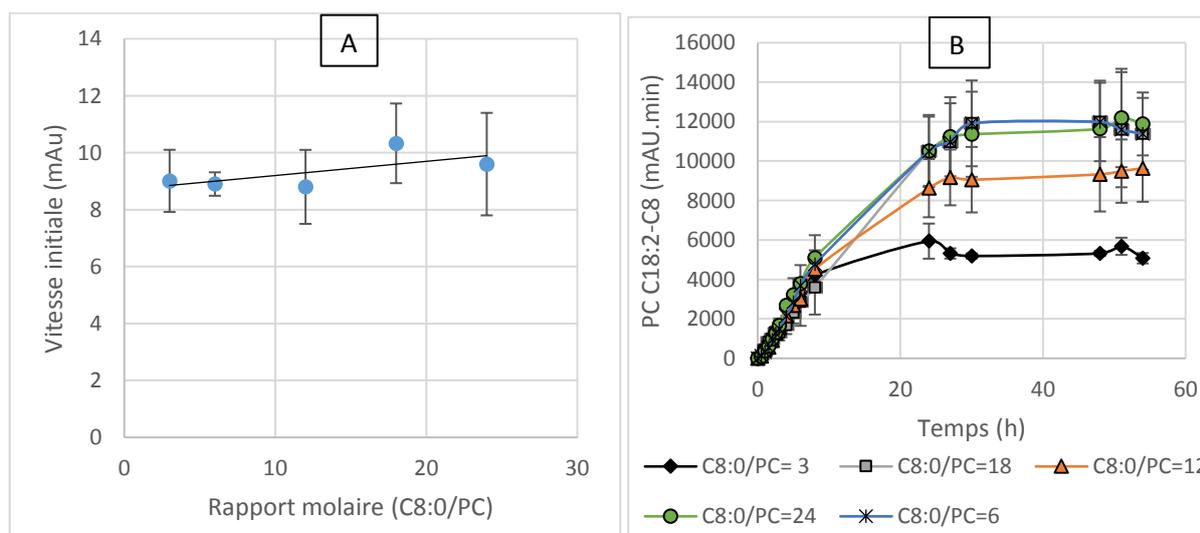


Figure 49 : Vitesses initiales (A) et cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique selon différents rapports molaires C8:0/PC (TL-IM, 45°C, 150 mg d'enzyme, $a_w=0,5$)

Des rapports molaires aussi élevés ne sont pas reportés dans la bibliographie. En effet, le plus souvent, ces réactions sont mises en œuvre en présence de solvant, limitant alors le besoin en acides gras faisant office de diluant. Cependant, Estiasih *et al.* [171] ont utilisé un rapport molaire de 3,8 dans une réaction d'acidolyse entre de la lécithine de soja et de l'EPA. Le pourcentage d'incorporation est de 22%. Peng *et al.* [173], toujours dans une réaction en milieu fondu ont utilisé un rapport molaire C8:0/PC de l'ordre de 5,5.

3.1.2.3 [Effet de l'activité de l'eau](#)

Il est parfaitement décrit qu'en conditions de forte hydratation de la lipase, l'équilibre de la réaction est déplacée vers la réaction d'hydrolyse. De plus, l'activité de l'eau joue un rôle important dans les réactions enzymatiques [119]. En effet, comme décrit dans la bibliographie, un nombre minimum de molécules d'eau fortement liées sont nécessaires pour que l'enzyme conserve sa structure et donc, sa fonction catalytique.

La Figure 50 A présentant les vitesses initiales, obtenues à des a_w initiales du milieu réactionnel et de la préparation enzymatique comprises entre 0,06 et 0,9, permet de mettre en avant qu'avec la lipase TL-IM, des activités de l'eau très faibles, de l'ordre de 0,06, ne mènent pas à une acidolyse efficace. En effet, une vitesse initiale très faible de l'ordre de 0,6 mAU est observée. Une vitesse initiale maximale de 10,3 mAU est obtenue pour une activité de l'eau de 0,5. La vitesse initiale diminue pour des activités de l'eau plus élevées.

La Figure 50 B présente les cinétiques des réactions obtenues avec les mêmes a_w que pour l'étude de la vitesse initiale. Cette figure met en avant que pour des a_w de l'ordre de 0,7 à 0,8, les plateaux atteints sont les plus élevés comparés à des valeurs d' a_w de 0,9 ou plus faibles. Les quantités de PC C18:2-C8 obtenues pour des activités de l'eau de 0,7 et 0,8 sont plus élevées que pour une activité de l'eau de 0,5 présentant pourtant une vitesse initiale maximale. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'activité de l'eau n'est pas contrôlée au cours de la réaction enzymatique. Elle est fixée uniquement en début de réaction.

L'activité de l'eau joue donc un rôle prépondérant dans la réaction d'acidolyse, c'est un facteur qui sera étudié dans le plan d'expériences. Les bornes de ce facteur sont choisies à 0,5 et 0,9. En effet, en termes de quantité de PC C18:2-C8 produite, il semble plus intéressant de se fixer dans cet intervalle malgré une diminution des vitesses initiales pour des activités de l'eau plus élevées.

Il a été démontré dans le cadre de l'acidolyse d'huile d'olive avec de l'acide caprique que plus l'activité de l'eau augmentait, meilleure était l'incorporation. Ceci n'est pas le cas dans nos observations ; en effet une activité de l'eau supérieure à 0,8 tend à diminuer l'incorporation de l'acide caprylique dans les phospholipides de tournesol. Cependant, les activités de l'eau élevées favorisent également la migration des chaînes acylées [210].

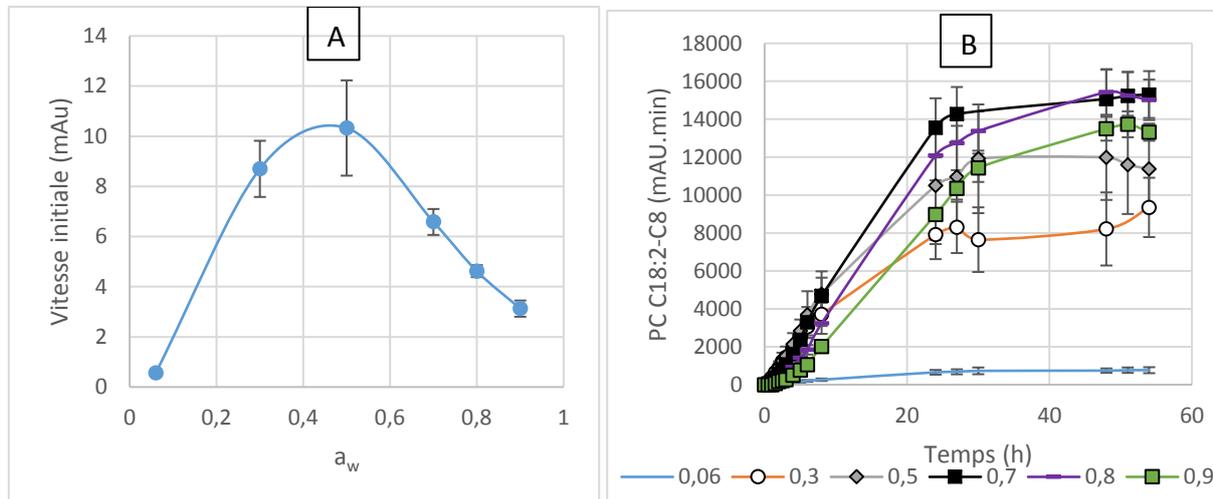


Figure 50 : Etude de l'effet de l'activité de l'eau de l'enzyme et de la préparation enzymatique sur la vitesse initiale (A) et les cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique (TL-IM, 45°C, C8:0/PC=18, 150 mg d'enzyme)

De l'eau est parfois ajoutée à la réaction pour favoriser l'incorporation des acides gras. Dans le cadre de notre étude, cela n'a pas été étudié car il a été mis en avant qu'avec une activité d'eau trop élevée, les quantités de PC C18-C8 produites aux plateaux diminuent. Ceci ajouté au fait que la migration des chaînes acyles est plus importante lorsque l'activité de l'eau est importante, il semble qu'il faille ajuster cette a_w à la valeur minimale permettant d'obtenir la plus forte production de PC C18:2-C8.

Il a été démontré par Pérignon *et al.* [119] en étudiant les isothermes de sorption de la lipase TL-IM qu'un phénomène d'hystérésis était observé. Ainsi, la lipase, à une activité de l'eau donnée, contient plus d'eau pendant la désorption que pendant l'adsorption. L'hypothèse avancée est que l'eau serait piégée dans le support d'immobilisation. Cette étude s'intéresse à l'interestérification entre de la tricapryline et de la trimyristine. Le produit de la réaction quantifié est un triglycéride contenant les deux acides gras d'origine. L'étude ne fait pas mention de phase de latence. L'activité enzymatique maximale est obtenue pour une a_w de 0,75. Cependant, c'est également l'activité de l'eau la plus élevée testée dans l'étude. Le phénomène d'hystérésis pourrait expliquer les phases de latence observées en début de réaction sur les

cinétiques obtenues dans notre étude. En effet, l' a_w n'est pas contrôlée tout au long de la réaction, il y a donc une absorption d'eau possible au cours de la réaction.

Pour la réalisation du plan d'expériences, c'est autour d'une valeur de 0,75 que sera centrée l' a_w .

3.1.2.4 Effet de la température

L'effet de la température sur la réaction d'acidolyse entre la PC de tournesol et l'acide caprylique a été étudié entre 25 et 65°C. En effet, la température est un facteur influençant largement les réactions catalysées par les lipases. Bien que l'immobilisation des lipases leur confère une certaine résistance, des températures trop importantes peuvent conduire à une dénaturation de l'enzyme ou bien peuvent conduire à une hydrolyse (Figure 51).

En effet, un déplacement de l'équilibre chimique de la réaction vers une hydrolyse peut être observé, conduisant à la formation de produits de la réaction non attendus, à savoir de la GPC ou de la LPC. Cette même observation a été faite par Vikbjerg *et al.* [179]. Dans la littérature, les réactions sont le plus souvent menées avec des températures comprises entre 40 et 60°C.

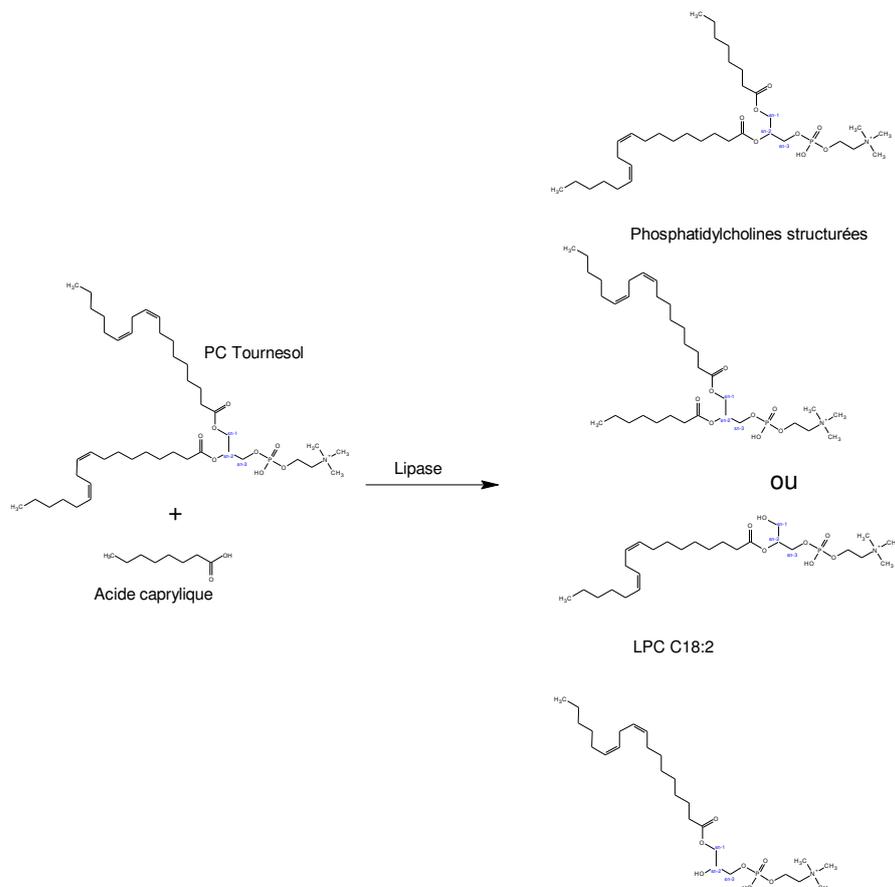


Figure 51 : Réaction d'acidolyse (phosphatidylcholines structurées) ou d'hydrolyse (LPC C18:2) entre acide caprylique et la phosphatidylcholine de tournesol

La Figure 52 A présente les vitesses initiales obtenues pour chaque température. Une vitesse initiale maximale est obtenue pour une acidolyse réalisée à une température de 45°C, ce qui est cohérent avec la littérature. Cependant, l'étude de la quantité de PC C18:2-C8 produite à 54h dont fait état la Figure 52 B, met en avant qu'avec une température de 35°C, la synthèse du produit attendu semble atteindre un maximum. Pour les températures faibles, à 54h de réaction, l'équilibre de la réaction n'est pas atteint mais les quantités de PC C18:2-C8 produites avoisinent déjà les 17800 mAU.min contre une valeur de 12000 mAU.min pour une température de 45°C, température à laquelle la vitesse initiale est la plus élevée.

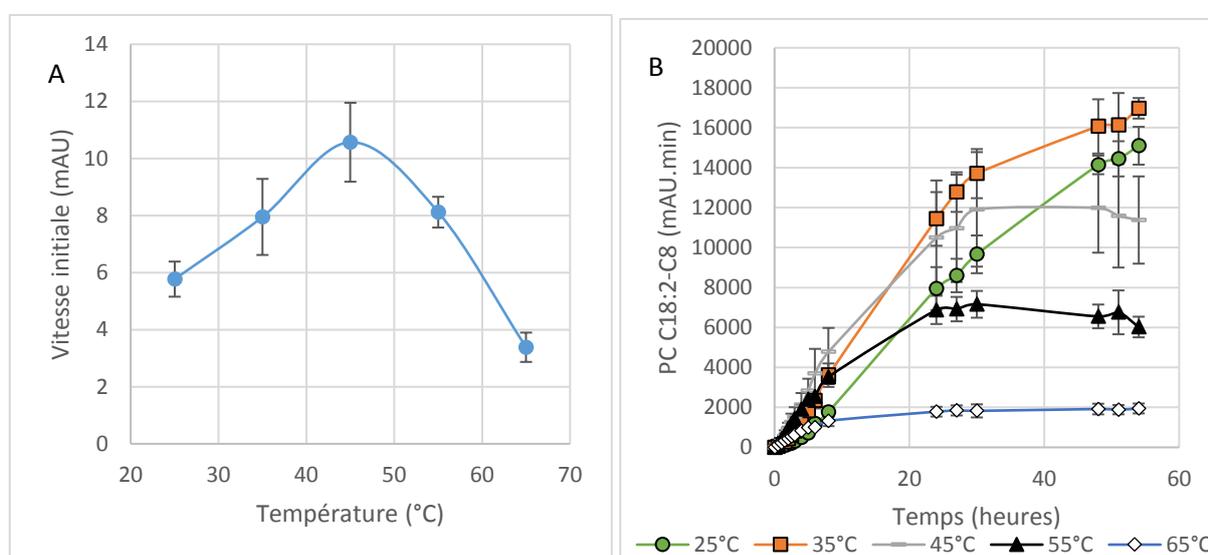


Figure 52 : Etude de l'effet de la température sur la vitesse initiale (A) et sur les cinétiques (B) de l'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique (TL-IM, C8:0/PC=18, 150 mg d'enzyme, aw=0,5)

Cette quantité de PC C18:2-C8 maximale atteinte pour des températures faibles peut s'expliquer par l'absence d'hydrolyse des phospholipides natifs ou des produits formés. La LPC C18:2 est un des produits de l'hydrolyse. La Figure 53 présente les cinétiques d'apparition de celle-ci. Au-delà d'une température de 45°C, la réaction d'hydrolyse est importante tandis qu'à 25°C et 35°C, celle-ci est modérée. Ceci n'est pas souhaitable car l'obtention de LPC C18:2 peut être dû à l'hydrolyse des phospholipides de tournesol, soit à l'hydrolyse du produit attendu, la PC C18:2-C8.

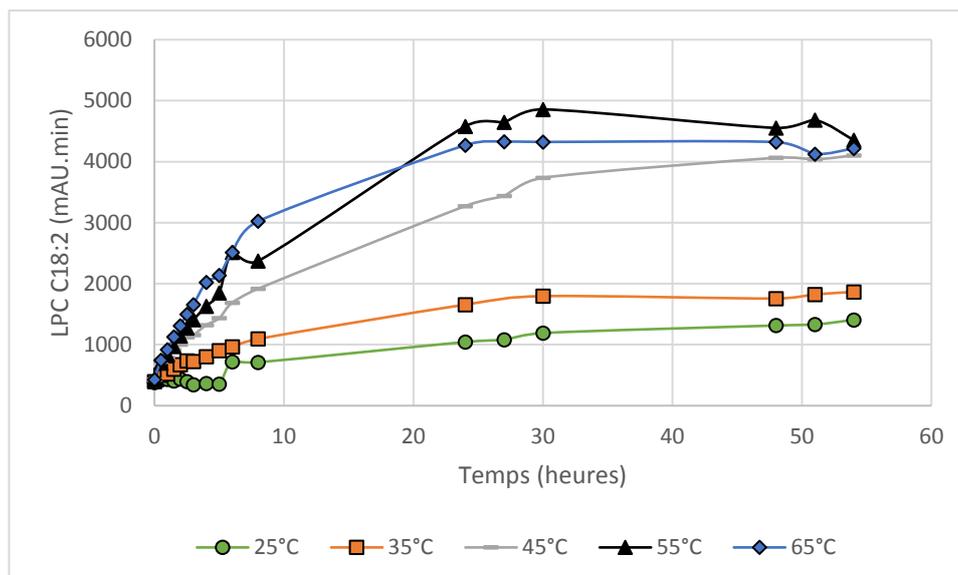


Figure 53 : Effet de la température sur l'apparition de LPC C18:2 lors de la réaction d'acidolyse de la PC de tournesol par de l'acide caprylique (TL-IM, C8:0/PC=18, 150 mg d'enzyme, aw=0,5)

Au terme de l'étude de ce bornage, il faut noter que des résultats différents sont obtenus selon la réponse étudiée. En effet, les conclusions ne sont pas les mêmes lorsque l'on s'intéresse aux vitesses initiales ou aux quantités de PC C18:2-C8 produites. Néanmoins, les deux réponses seront prises en compte pour la réalisation du plan d'expériences. En effet, les études statistiques permettront de mettre en avant laquelle des deux réponses est la plus pertinente à utiliser pour définir les niveaux optimaux des facteurs de la réaction d'acidolyse étudiée.

A l'issue de ce bornage, deux facteurs ont un effet notable sur la réaction étudiée, à savoir, la température et l'activité de l'eau. L'intervalle sur lequel va être étudiée la température est compris entre 25 et 55°C. L'intervalle pour l'étude de la température reste assez large pour confirmer l'hydrolyse et en étudier les effets avec des activités de l'eau différentes. Pour l'activité de l'eau, l'intervalle est compris entre 0,5 et 0,9.

Le rapport molaire sera quant à lui fixé à 18. Un rapport molaire plus faible mène à des rendements de synthèse plus faible, excepté pour un rapport molaire de 6 qui n'a pas été retenu, tandis qu'un rapport molaire plus élevé ne permet pas d'obtenir une meilleure production de PC C18:2-C8 et complique de futures étapes de purification.

3.1.3 Plan d'expériences

Les expérimentations ont été réalisées en considérant les deux facteurs qui ont été définis précédemment comme ayant une influence sur l'activité catalytique de la lipase TL-IM dans le cadre de l'acidolyse de PC de tournesol avec de l'acide caprylique à savoir :

- La température
- L'activité de l'eau.

A chacun des facteurs est attribué trois niveaux avec une valeur basse (-1), une valeur haute (+1) et une valeur centrale (0) pour étudier les effets de ces variables indépendantes prédéterminées par le bornage. Cela permet de mettre en évidence l'existence possible d'interactions entre les facteurs étudiés. Douze expériences ont été réalisées comprenant 4 répétitions au centre du domaine d'expérimentation (40°C et $a_w=0,7$).

Pour prédire les conditions optimales de la réaction de synthèse de PC C18:2-C8 et déterminer l'influence des facteurs étudiés, différentes expérimentations ont été exécutées comme décrit par la matrice d'expériences présentée dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Matrice d'expérience des réactions d'acidolyse réalisées pour la détermination des conditions optimales. (En italique, les valeurs pour lesquelles le plateau n'est pas atteint)

N° d'expérience	Température (°C)	a_w	Absorbance de la PC C18:2-C8 (mAU.min)	Vi (mAU)
1	25	0,5	<i>12673</i>	4,53
4	25	0,7	<i>11651</i>	5,78
7	25	0,9	<i>9782</i>	4,55
2	40	0,5	20687	11,83
5	40	0,7	19559	11,51
8	40	0,9	19068	8,32
10	40	0,7	20531	12,43
11	40	0,7	23122	13,41
12	40	0,7	23051	13,12
3	55	0,5	5778	18,13
6	55	0,7	10534	17,18
9	55	0,9	5069	3,13

Les réactions d'acidolyse sont réalisées dans les mêmes conditions que lors de l'étape de bornage. Comme défini lors de l'étape de bornage, le rapport molaire C8:O/PC est fixé à 18 et la quantité d'enzyme est fixée à 150 mg pour une masse en substrat de 1g. La lipase utilisée est TL-IM, cela a été déterminé lors du criblage enzymatique présenté dans la partie III, paragraphe

3.1.1. Les niveaux de température et d'activité de l'eau sont contrôlés selon les expériences comme mentionné dans la matrice (Tableau 24).

Deux réponses sont considérées, la vitesse initiale ainsi que la quantité de PC C18:2-C8 produite en 54 h faisant état de la quantité de celle-ci au sein du mélange réactionnel et qui correspond, le plus souvent, à l'absorbance au plateau (pour les températures faibles, les plateaux ne sont pas atteints à 54h). Afin d'avoir des vitesses initiales fiables, lors des 3 premières heures, des mesures sont réalisées toutes les 30 min puis toutes les heures jusqu'à 8h de synthèse. Les jours suivants, 3 mesures espacées de 3 heures sont réalisées.

La suite de ce travail, c'est à dire l'analyse du plan d'expériences est divisé en deux parties, l'une traitant de la réponse « quantité de PC C18:2-C8 en 54h » et l'autre traitant de la réponse « vitesse initiale ». Avec la méthode des plans d'expériences, la désirabilité peut être étudiée. Elle correspond à la recherche de paramètres optimaux pour plusieurs réponses. La désirabilité peut être étudiée, comme c'est le cas dans l'étude de Ifeduba et Akoh [195], pour déterminer les conditions optimales permettant l'incorporation d'acide caprylique dans une huile de soja riche en acide stéaridonique tout en limitant la migration des chaînes acyles en cours de réaction. Les réponses considérées étaient l'incorporation de l'acide caprylique dans les triglycérides et la position de celui-ci sur le squelette glycérol.

Ceci n'a pas été étudié dans cette étude car les réponses sont trop différentes. La vitesse initiale est fortement liée à l'activité de l'eau, or celle-ci n'est pas contrôlée en cours de réaction et varie avec le temps. Après 54h de réaction, heure à laquelle la quantité de PC C18 :2-C8 est déterminée, l' a_w n'est plus la même qu'initialement. Il est alors difficile de croiser les deux réponses considérées au sein d'une étude de désirabilité.

3.1.3.1 Analyse du plan basée sur la production de PC C18:2-C8 obtenue en 54h

L'analyse des résultats et l'optimisation par la méthode de surface de réponse a été réalisée avec pour réponse, la quantité de PC C18:2-C8 à 54h, grâce au logiciel Modde. Pour étudier le modèle, plusieurs paramètres statistiques ont été étudiés :

- le R^2 , qui est une mesure de la qualité du modèle. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que les moyennes des réponses.
- le Q^2 , qui correspond au pourcentage de variation dans la réponse prédite par le modèle.

Plus ces deux coefficients sont proches de 1, meilleur sera le modèle, c'est-à-dire qu'il sera conforme aux résultats expérimentaux (R^2 élevé) et prédictif (Q^2 élevé).

La Figure 54 représente la régression des coefficients du polynôme. Le modèle postulé prend la forme d'un polynôme de second degré de la forme :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1-1} X_1^2 + \beta_{2-2} X_2^2 + \beta_{1-2} X_1 X_2$$

Les valeurs de β_0 , β_1 , β_2 , β_{1-2} sont les coefficients du polynôme. L'influence des facteurs et de leurs interactions est évaluée par l'intermédiaire des coefficients du modèle postulé. Il faut donc trouver une valeur étalon pour juger de l'importance d'un coefficient. Cet étalon sera l'écart-type du coefficient. Ainsi, la valeur du coefficient est comparée à la valeur de son écart-type.

Le diagramme à barre représente l'influence de chaque facteur sur la réponse ainsi que la valeur de l'écart-type du coefficient. Ainsi, pour lire le diagramme à barre, plus la barre représentant le facteur est importante, plus celui-ci influence la réponse. Si la barre est orientée du côté négatif, alors, plus l'on augmente ce facteur plus la réponse diminue. Toutefois, lorsque l'écart-type enjambe le 0, alors le facteur considéré n'est pas significatif. L'écart-type relate l'incertitude de chaque coefficient. La taille de ces barres d'erreur dépend de trois paramètres: la qualité des expériences réalisées, le modèle de régression et le nombre de degrés de liberté. Si l'orientation de la barre est du côté positif, il peut être interprété que plus l'on augmente ce facteur plus la réponse augmente. Ici, c'est le cas pour 3 coefficients qui sont la température x a_w , $l'a_w$ ainsi que $l'a_w \times a_w$.

La Figure 54 met en avant que seule la température joue un rôle prépondérant sur les quantités de PC C18:2-C8 synthétisées en 54h, ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés sur la Figure 53B (Partie III, Paragraphe 3.1.2.4). Au contraire, tous les coefficients s'intéressant à l'activité de l'eau ont un écart type enjambant le 0, rendant ainsi ces coefficients non significatifs. Ainsi, l'activité de l'eau, dans le domaine expérimental étudié, ne semble pas jouer un rôle majeur sur cette réponse. Ce résultat est contradictoire avec ceux trouvés sur la Figure 50B (Partie III, Paragraphe 3.1.2.3)

La valeur R^2 indique que plus de 96% de la variabilité dans les réponses peut être expliquée par l'équation polynomiale de second degré générée par le plan d'expériences. De plus le Q^2 étant élevé (0,779), le modèle est prédictif, c'est-à-dire qu'il permet de prévoir la quantité de PC C18:2-C8 produite en 54h dans l'ensemble du domaine expérimental.

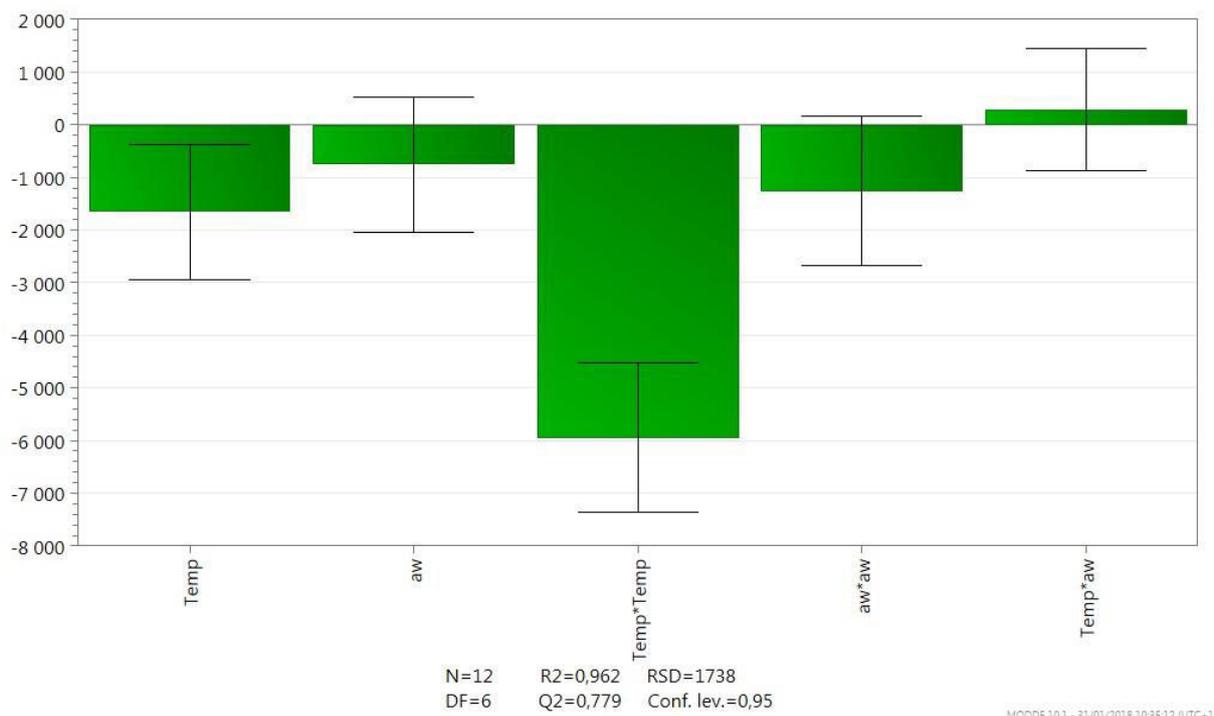


Figure 54 : Régression des coefficients avec leur intervalle de confiance du plan d'expériences basé sur la quantité de PC C18:2-C8 synthétisée en 54h (Temp : Température, a_w : activité de l'eau)

L'optimisation de la quantité de PC C18:2-C8 formée lors de synthèse à 54h à l'aide du modèle, a permis d'obtenir une représentation sous forme de surface de réponse (Figure 55). L'intérêt d'une telle modélisation est de définir les conditions optimales de synthèse de PC C18:2-C8.

La Figure 55 présente la surface de réponse obtenue pour la PC C18:2-C8 à 54h. Sur ce genre de représentation, à chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée surface de réponse. On ne connaît que quelques points qui ont été testés expérimentalement. L'interpolation à l'aide du modèle mathématique établi permet d'obtenir les réponses inconnues. L'exécution du modèle par le logiciel Modde met en avant que la quantité de PC C18:2-C8 produite en 54h est maximale pour une température de 38°C ainsi que pour une activité de l'eau de 0,7 et prédit une valeur au plateau de 22500 mAU.min (Figure 55). Il est important de vérifier la validité du modèle lors d'une étape finale. Ainsi une dernière manipulation a été réalisée afin de vérifier si la réponse prédite par le modèle pour une température de 38°C et une activité de l'eau de 0,7 donnait la réponse attendue. Cette expérience avec les facteurs prenant les valeurs optimales déterminées par le plan d'expériences a été réalisée. La cinétique est présentée sur la Figure 56. Le plateau (54h) atteint la valeur de 22335 mAU.min, cette valeur est très proche de celle attendue. En effet, la variation entre la réponse attendue et la réponse trouvée est de 0,7%. Le modèle établi est donc prédictif et validé. Le plan

d'expériences a permis d'améliorer la quantité de PC C18:2-C8 formée au cours de la réaction d'acidolyse. En effet, la quantité de PC C18:2-C8 était de 16000 mAU.min avant optimisation et est à présent de 22335 mAU.min.

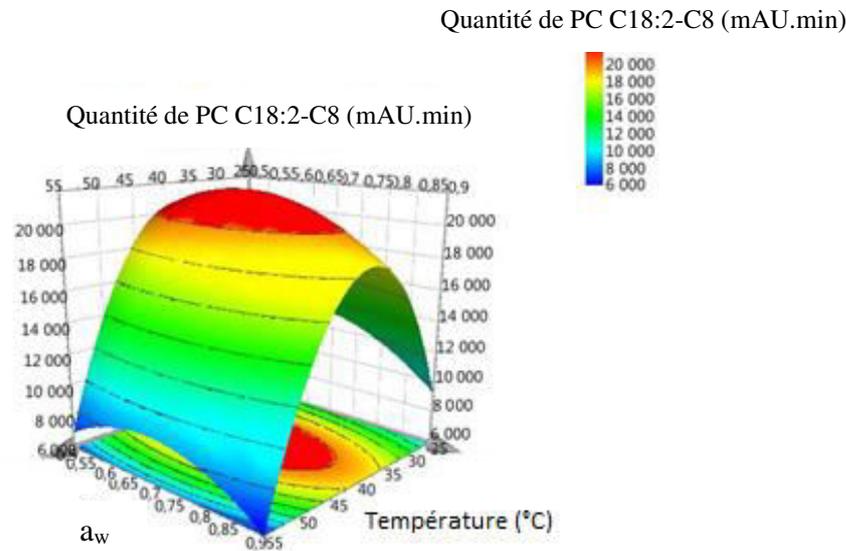


Figure 55 : Surface de réponse de la quantité de PC C18:2-C8 produite en 54h en fonction de la température et de l'activité de l'eau

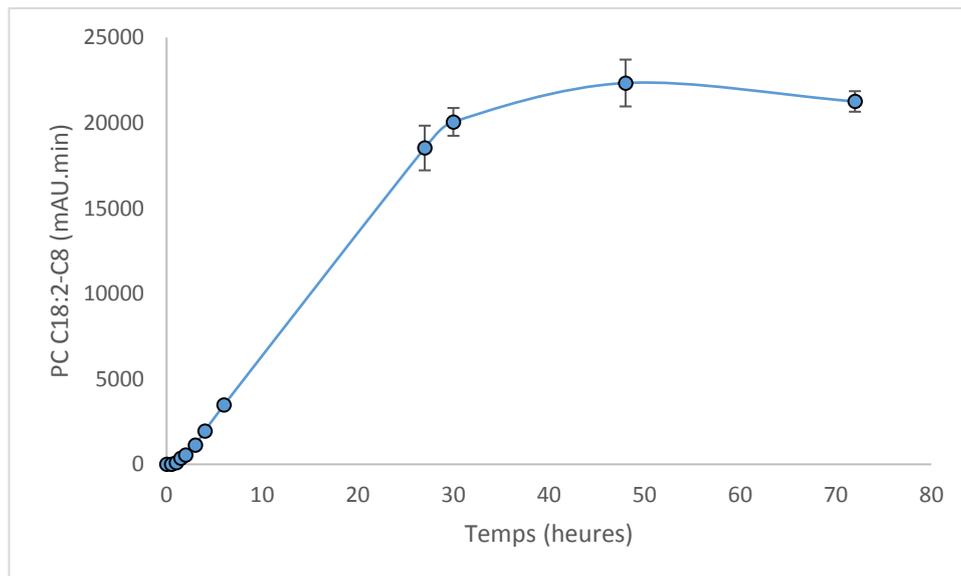


Figure 56 : Cinétique enzymatique de l'acidolyse de PC de tournesol par de l'acide caprylique dans les conditions optimales obtenues par le plan d'expériences (TL-IM, 38°C, 150 mg d'enzyme, rapport molaire C8:O/PC=18, $a_w=0,7$)

Vikbjerg a également réalisé un plan d'expériences pour optimiser l'incorporation d'acide caprylique dans de la phosphatidylcholine de soja avec la lipase RM-IM. Les paramètres considérés dans cette étude sont la quantité d'enzyme, la température de réaction, l'addition d'eau, le temps de réaction et le ratio molaire. Une incorporation de 49% a été obtenue avec 40% d'enzyme, un temps de réaction de 70 h, une température de 55°C et un ratio molaire

d'acide caprylique/PC de 6. Il a pu démontrer que tous les paramètres étudiés ont un effet sur la réaction excepté l'ajout d'eau. La quantité de PC diminue au profit de la formation de LPC lorsque la température et le rapport molaire augmentent [169].

Le travail réalisé montre également que lorsque les températures augmentent, la quantité de PC C18:2-C8 diminue au profit de LPC C18:2, cependant, il n'a pas été observé une augmentation de LPC C18:2 lorsque le rapport molaire augmente. Les optima de température et de temps de réaction ne peuvent être comparés car le travail est réalisé avec la lipase TL-IM et non RM-IM.

3.1.3.2 Analyse du plan basée sur la vitesse initiale obtenue

L'analyse du plan d'expériences est à présent réalisée selon une autre réponse, la vitesse initiale de la réaction. Les deux facteurs étudiés sont donc toujours les mêmes à savoir, l'activité de l'eau et la température.

La Figure 57 présente les coefficients de régression obtenus avec cette nouvelle modélisation. Cette figure met en avant que les deux facteurs étudiés ainsi que leur interaction ont une influence sur la vitesse initiale, excepté pour l'interaction Temps x Temps.

Une activité de l'eau élevée tendrait à diminuer les vitesses initiales, tandis que des températures élevées favoriseraient celles-ci (Figure 57). Ces observations sont conformes à ce qui a été observé précédemment (Figure 51 A). Le R^2 de 0,934 indique que 93 % de la variabilité dans les réponses peuvent être expliqués par l'équation polynomiale de second degré définissant le plan d'expériences. Cependant, ce modèle sera moins prédictif que celui obtenu avec les quantités de PC C18:2-C8 produites en 54h. En effet, le Q^2 est de 0,67.

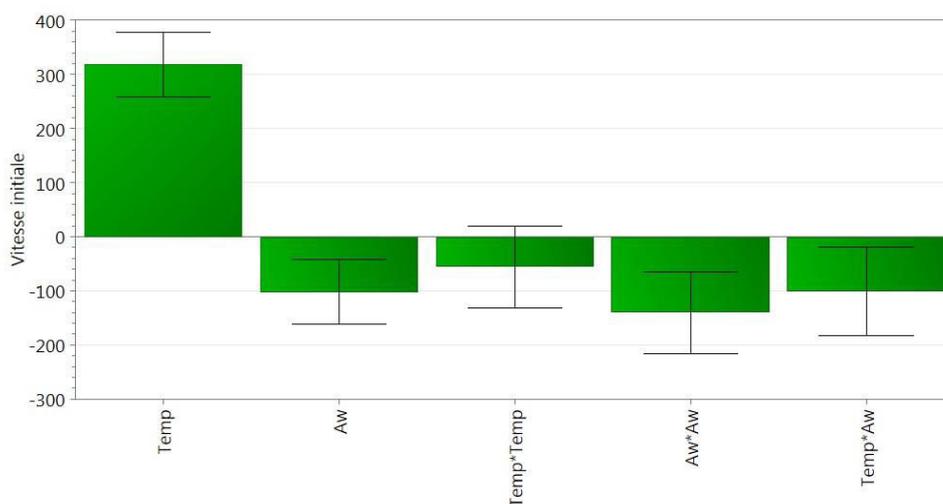


Figure 57 : Régression des coefficients avec leur intervalle de confiance pour le plan d'expériences basé sur la vitesse initiale pour réponse (Temp :Température, a_w : activité de l'eau)

Une représentation sous forme de surface de réponse a également été réalisée (Figure 58). La vitesse initiale la plus élevée se trouve aux bornes du domaine expérimental choisi. Ceci n'est pas étonnant. En effet, lors de la définition des bornes du domaine, la réponse qui a été favorisée est la quantité de PC C18:2-C8 produite en 54h. Ainsi, d'après le logiciel Modde pour obtenir une vitesse initiale optimale, il faudrait se placer à une activité de l'eau de l'ordre de 0,5 et une température de 55°C. Les vitesses initiales obtenues, pourraient, semble t'il, être plus élevées avec une a_w plus faible et une température plus élevée, mais cela nécessiterait de refaire un plan d'expériences avec un domaine expérimental plus étendu ou déplacé. En effet, aucun optimum n'est obtenu en termes de vitesse initiale dans le domaine expérimental choisi. Ainsi, étendre le domaine permettrait d'inclure cet optimum dans les résultats. Il serait donc intéressant, en termes de vitesses initiales de tester des a_w inférieures à 0,5 et d'aller au-delà de 55°C pour le facteur température.

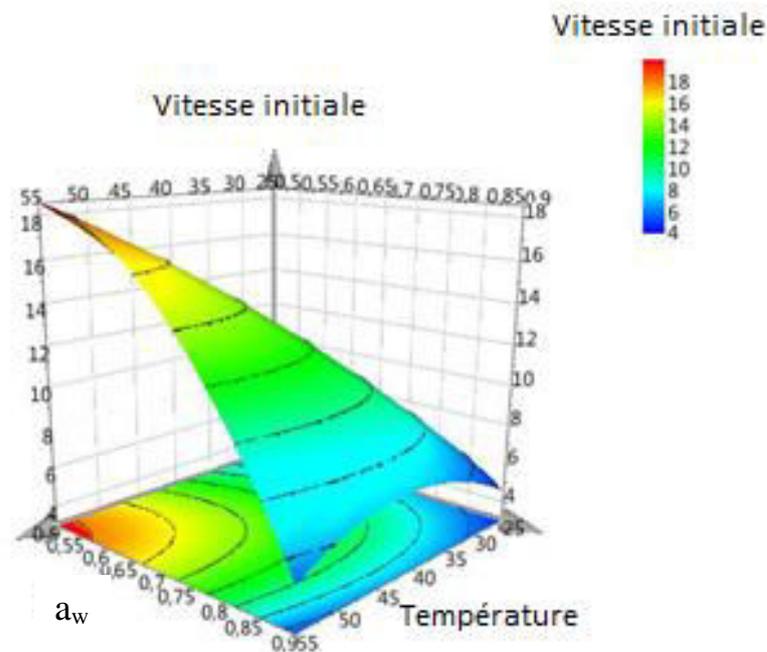


Figure 58 : Vitesses initiales de synthèse de PC C18:2-C8 en fonction de l'activité de l'eau et de la température

3.1.3.3 [Bilan sur les deux plans d'expériences](#)

Lors de la comparaison des résultats des plans d'expériences analysés avec deux réponses différentes, les résultats obtenus sont différents quant aux valeurs que devraient prendre l'activité de l'eau et la température dans le but d'optimiser la réponse.

Ainsi, l'activité de l'eau semble jouer un rôle très important sur la vitesse initiale de la réaction tandis que ce n'est pas le cas lors de l'étude de la production de PC C18:2-C8 en 54h. Lorsque celle-ci augmente, la vitesse initiale diminue. L'activité de l'eau n'est contrôlée qu'en début de réaction. En effet, aucun système au sein du laboratoire ne permet de maintenir une activité de l'eau constante durant toute la durée de la réaction enzymatique. Il peut donc être supposé qu'après 54h de réaction, l'activité de l'eau n'est plus celle imposée en début de réaction enzymatique, expliquant ainsi le résultat différent entre ces deux réponses.

En parallèle, l'étude de la température montre que de fortes températures semblent améliorer la vitesse initiale. En effet, il est admis que les optimums de température pour la lipase TL-IM se trouvent aux alentours de 55°C. Or, il a été mis en évidence dans la partie III, paragraphe 3.1.2.4 que des températures élevées abaissaient les valeurs obtenues aux plateaux, vraisemblablement à cause d'une réaction d'hydrolyse se mettant en place et conduisant à la synthèse de LPC C18:2 au détriment de la PC C18:2-C8.

A l'issue de ces expériences, il semblerait que pour améliorer les résultats obtenus en termes de quantité de PC C18:2-C8 produites en 54 h, tout comme en termes de vitesses initiales, il faudrait pouvoir contrôler l'activité de l'eau au cours de la réaction.

Dans les conditions actuelles de réalisation des réactions enzymatiques, il est plus intéressant de se baser sur les résultats obtenus avec le plan d'expériences s'intéressant à la quantité de la PC C18:2-C8. Ainsi, il a été mis en évidence qu'un optimum était atteint pour une température de 38°C et une a_w de 0,7. Ainsi pour l'application sur les phospholipides microalgaux, ces deux facteurs vont être réglés à ces valeurs.

La faible température de réaction déterminée par le plan d'expériences est un avantage quant à la réaction que l'on souhaite mettre en place par la suite. En effet, les températures élevées mènent à la migration des chaînes acylées de la position sn-2 à la position sn-1, conduisant ainsi à la formation de LPC. Or sur les phospholipides microalgaux, le DHA est principalement acylé en position sn-2, il n'est donc pas souhaitable qu'il y ait des phénomènes de migration des chaînes acyles lors de l'acidolyse de ces phospholipides, au risque d'obtenir de la LPC DHA. De plus, une faible température de réaction permet de limiter l'oxydation du DHA qui est une molécule fortement oxydable, et ce, malgré la présence d'antioxydant.

3.1.4 Acidolyse des phospholipides microalgaux

Les valeurs des paramètres obtenues par la technique du plan d'expériences s'intéressant aux quantité de PC C18:2-C8 produites en 54 h de synthèse ont été appliquées à l'acidolyse des phospholipides microalgaux de *Tisochrysis lutea* avec de l'acide caprylique.

Ces phospholipides présentent une forte proportion en DHA, c'est pourquoi ils sont utilisés dans ce travail. Le deuxième acide gras trouvé en forte proportion dans ces phospholipides est l'acide myristique. Il est formulé l'hypothèse que le phospholipide portant un DHA et un acide myristique est le plus abondant dans les phospholipides microalgaux. La réaction d'acidolyse peut alors être représentée tel que montré sur la Figure 59.

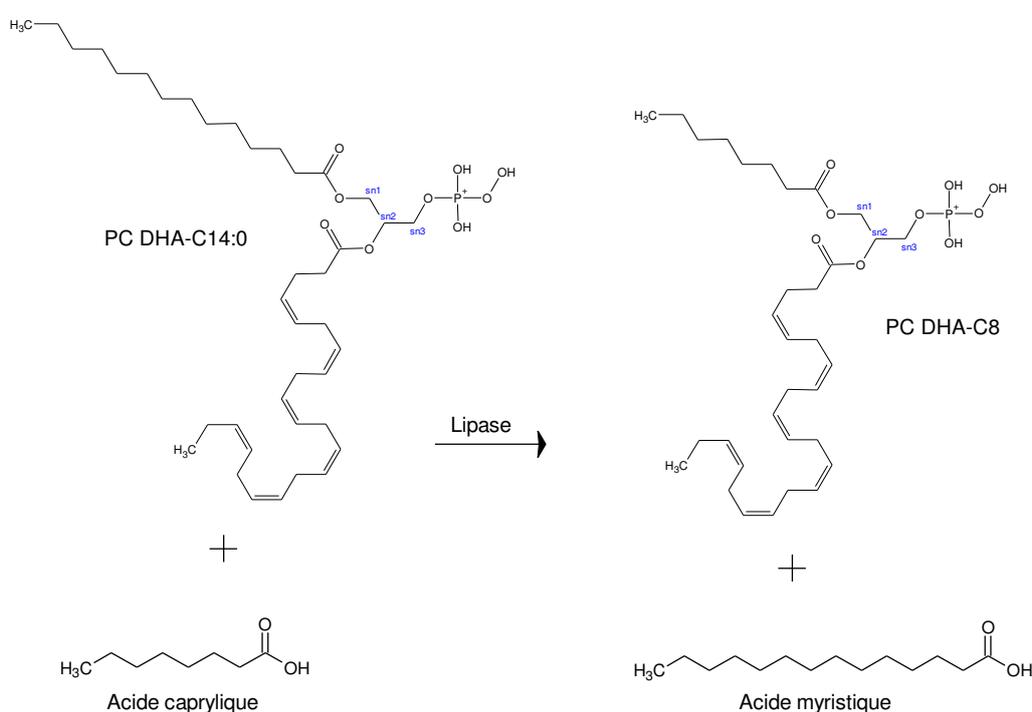


Figure 59 : Réaction d'acidolyse entre les phospholipides microalgaux de *Tisochrysis lutea* et l'acide caprylique

La réaction d'acidolyse a été réalisée en milieu fondu avec un rapport molaire acide caprylique/phospholipides microalgaux de 18 et une température de 38°C. Les substrats ainsi que la préparation enzymatique de TL-IM ont été équilibrés à une a_w de 0,7 et la quantité de préparation enzymatique était de 15% de la masse en substrat (150 mg). Un antioxydant naturel, le sésamol à hauteur de 8,3 mM a également été ajouté au milieu afin de protéger le DHA d'une éventuelle oxydation durant la réaction.

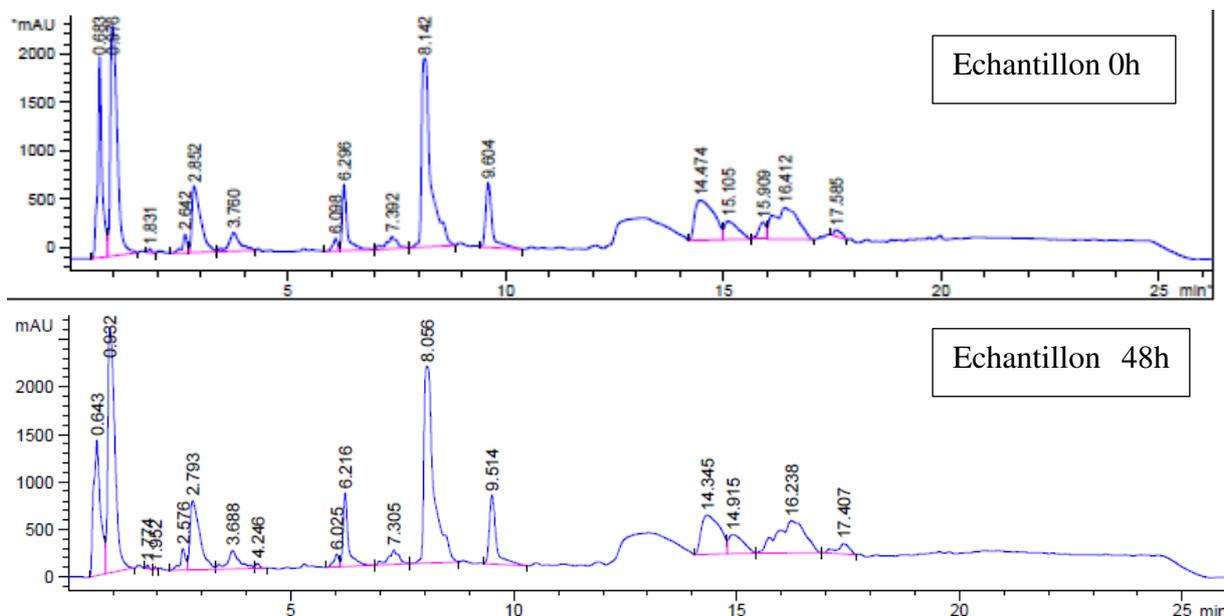


Figure 60 : Chromatogrammes d'échantillons d'acidolyse des phospholipides microalgaux avec de l'acide caprylique par la lipase TL-IM. Analyse HPLC, détection UV (205nm) (Température : 38°C, Rapport molaire C8:0/PL=18, 150 mg d'enzyme, $a_w = 0,7$)

Il a été identifié par UHPLC-MS que la PC DHA-C8 a un temps de rétention de 10,6 min et que la LPC DHA a un temps de rétention de 6,5 min (Partie III, paragraphe 1.2.1).

L'observation des chromatogrammes (Figure 60) ne permet pas de mettre en évidence l'apparition d'un pic à 10,6 min. Cependant, un pic à 6,2 min est présent après 48h de synthèse sur les témoins à 0 et 48 h et sur l'échantillon de synthèse à 48 h ; il semble toutefois plus important sur l'échantillon de synthèse. Ce laisse suggérer la formation de LPC DHA, il n'est pas impossible qu'il y ait un petit décalage des temps de rétention lié à la nature de l'échantillon. Il y aurait donc hydrolyse des phospholipides microalgaux au cours de la réaction enzymatique mais pas d'acidolyse.

L'expérimentation n'a pas permis de mettre en évidence l'acidolyse des phospholipides microalgaux. Ceci pourrait être dû à une inhibition de l'enzyme par une molécule présente dans l'extrait microalgal ou encore à la non observation de la molécule d'intérêt par la méthode analytique considérée. En effet, l'échantillon est composé de nombreuses molécules rendant difficile l'interprétation des chromatogrammes. Une analyse par LC-MS aurait peut-être permis de mettre en évidence la présence de PC DHA-C8 au sein de l'échantillon.

3.2 Synthèse de PC DHA-C8 par estérification

Une deuxième voie de synthèse permettant d'obtenir de la PC DHA-C8 a été étudiée. Dans cette partie, l'estérification de la glycérophosphocholine (GPC) avec de l'acide caprylique et du DHA est réalisée (Figure 61). Après un criblage enzymatique, les paramètres de la réaction

étudiés sont : le rapport molaire, la quantité d'enzyme, l'effet du vide et la température. Les molécules de PC DHA-C8 synthétisées par cette voie pourront servir de standard pour la réaction d'acidolyse entre les phospholipides microalgaux et l'acide caprylique.

Cette réaction peut conduire à la formation de 5 molécules à savoir de la PC DHA-C8, de la PC DHA-DHA, de la PC C8-C8, de la LPC DHA et de la LPC C8. L'eau est un co-produit de la réaction et sera probablement un problème à traiter. En effet, si elle n'est pas enlevée au fur et à mesure de la réaction, elle modifiera l'équilibre de la réaction par la mise en place de réaction d'hydrolyse. La méthode analytique utilisée permet la quantification de 3 d'entre-elles : la PC DHA-C8, la PC DHA-DHA et la LPC DHA. L'objectif de ce travail est d'optimiser la synthèse de PC DHA-C8. Les résultats sont présentés en termes de vitesses initiales et de rendements. Pour mémoire, le rendement est calculé par rapport à la GPC initiale (Partie II, paragraphe 4.3).

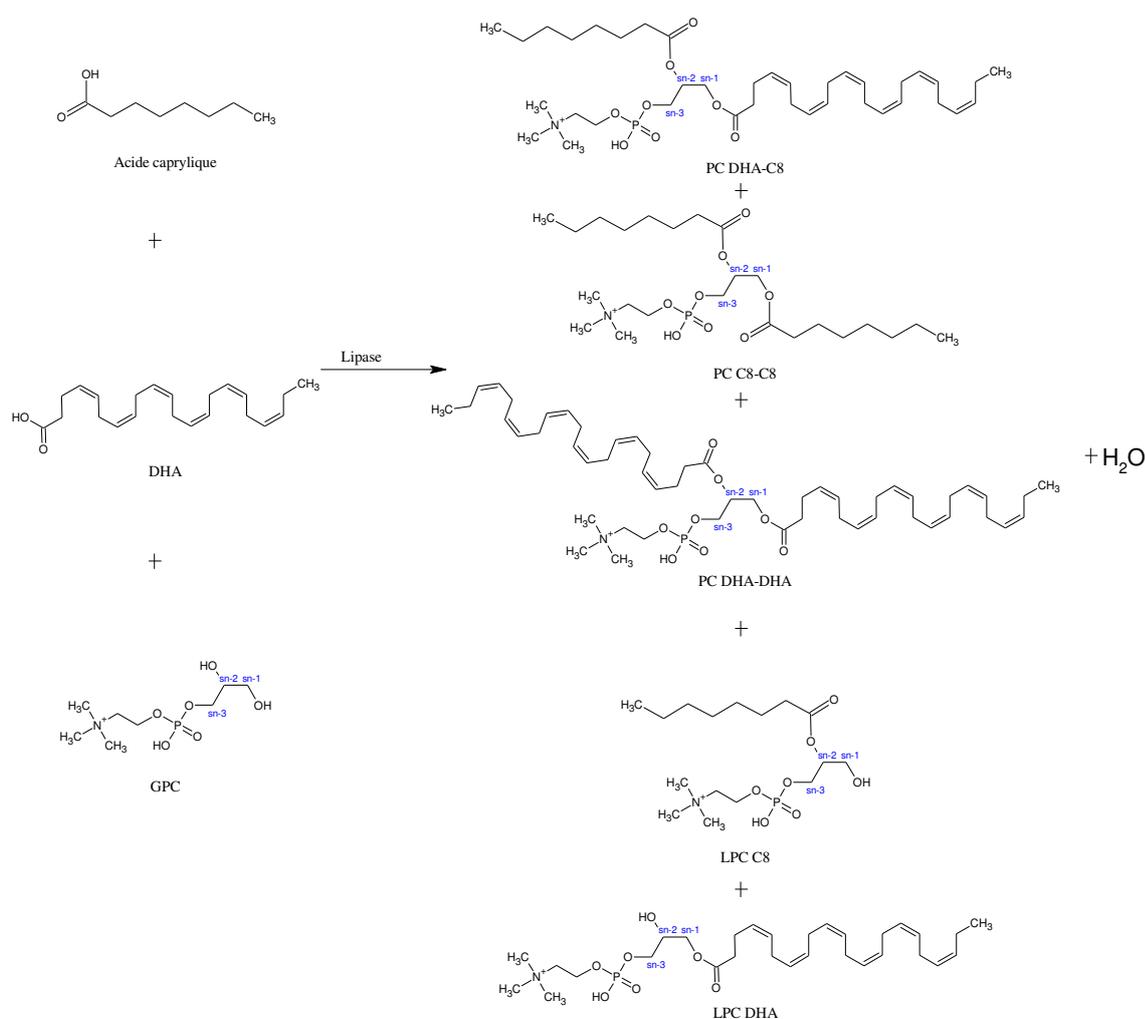


Figure 61 : Réaction d'estérification par une lipase entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA

3.2.1 Criblage enzymatique

Quatre lipases commerciales ont été testées par rapport à leur capacité à synthétiser de la PC DHA-C8, à savoir, la lipase TL-IM, la lipase RM-IM, la lipase Novozym 435 et la lipase Novozym 40086. Les réactions d'estérification sont réalisées en milieux fondus. Ces réactions sont effectuées sous vide à 100 mbar afin d'éliminer l'eau produite au cours de la réaction. Le rapport molaire utilisé est de 1/3/15 (GPC/C8:0/DHA). La température est fixée à 45°C et la quantité de lipase est de 15% de la masse en substrat. Les réactions sont suivies pendant 54h afin d'obtenir des cinétiques. Il est apparu lors de l'analyse de ce criblage que le composé majoritairement synthétisé est la LPC DHA, c'est pourquoi les résultats de synthèse de la LPC DHA sont également présentés, à la suite des résultats pour la PC DHA-C8 et la PC DHA-DHA.

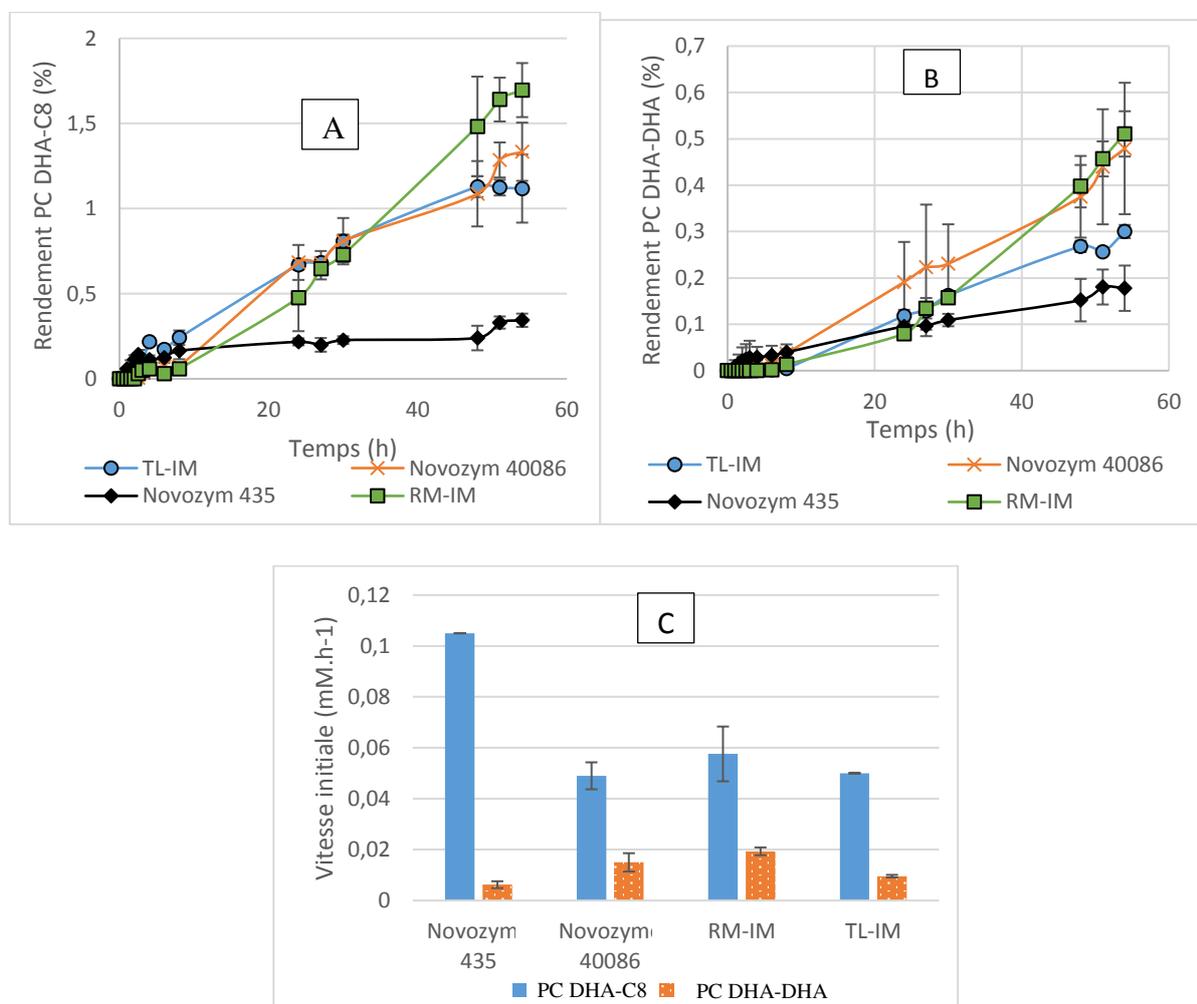


Figure 62 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA obtenu pour 4 lipases commerciales (45°C, rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, quantité d'enzyme= 15% de la masse en substrat, 100 mbar)

La Figure 62 A montre que les 4 lipases étudiées sont en capacité de synthétiser la PC DHA-C8. La lipase Novozym 435 atteint en 6 h un plateau avec un rendement de synthèse le plus faible de 0,2%. La lipase permettant d'obtenir le rendement le plus important est la lipase RM-IM (1,7%). Les lipases Novozym 40086 et TL-IM présentent des cinétiques semblables, les rendements, si les barres d'erreurs sont considérées, sont très proches et de l'ordre de 1,2%. La Figure 62 C présente les vitesses initiales obtenues avec chaque lipase. Toujours en s'intéressant à la synthèse de PC DHA-C8, la lipase Novozym 435 a la vitesse initiale la plus élevée ($0,1 \text{ mM.h}^{-1}$), les vitesses initiales pour les lipases Novozym 40085, RM-IM et TL-IM ont des valeurs égales de l'ordre de $0,05 \text{ mM.h}^{-1}$. Malgré la vitesse initiale importante obtenue avec Novozym 435, le rendement obtenu impose d'écarter cette enzyme pour la suite de l'étude. RM-IM est une lipase qui n'est actuellement plus commercialisée. Afin de rendre pérenne cette recherche, le choix ne s'orientera donc pas vers cette lipase. Les résultats proches obtenus par TL-IM et Novozym 40086 ne permettent pas de les départager. Le temps manquant à la réalisation de l'ensemble de ces expériences pour ces 2 lipases, la lipase TL-IM a été retenue pour la suite de l'étude.

Les Figure 62 B et C montrent les cinétiques et les vitesses initiales de la synthèse de PC DHA-DHA. La lipase RM-IM et Novozym 40086 conduisent en 54h à un rendement de synthèse de 0,5%. Ces deux enzymes ont également les vitesses initiales les plus importantes pour ce produit.

Dans ces conditions de synthèse, les rendements sont plus importants pour la PC DHA-C8 que pour la PC DHA-DHA. Mais ils restent cependant très faibles et nécessitent d'être améliorés. Seule la faisabilité de la réaction a été démontrée.

La Figure 63 A permet d'analyser la synthèse de LPC DHA durant l'estérification. Contrairement à ce qui a pu être observé pour les PC DHA-DHA et PC DHA-C8, pour ce produit de synthèse, la lipase Novozym 435 est la plus à même de synthétiser ce produit, atteignant sans optimisation un rendement de 16%. La vitesse initiale avec cette lipase est de 11 mM.h^{-1} (Figure 63 B). Les lipases TL-IM, Novozym 40086 et RM-IM permettent d'atteindre un rendement de synthèse de 10%. Novozym 435 pourrait présenter une sélectivité de substrat pour le DHA mais la faible production de PC DHA-DHA par cette enzyme permet de formuler l'hypothèse d'une sélectivité de position.

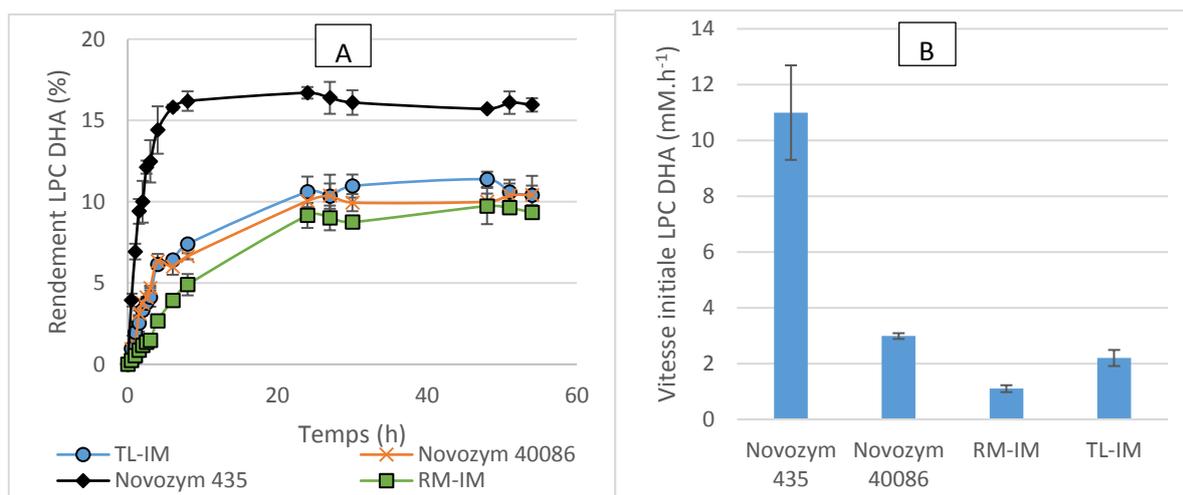


Figure 63 : Cinétiques (A) et vitesses initiales (B) de la production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA obtenues pour 4 lipases commerciales (45°C, rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, quantité d'enzyme=15% de la masse en substrat, 100 mbar)

Le Tableau 8 (partie 1, paragraphe 3.3.2.2) met en avant que pour la synthèse de PC, les lipases retrouvées sont RM-IM, Novozym 435, la lipase issue de *R. arrhizus* et la lipase issue de *R. oryzae* lorsque le substrat est un lysophospholipide et le plus souvent, ces réactions sont catalysées en présence de toluène. Avec de la GPC pour substrat, c'est RM-IM qui est mentionnée. La lipase TL-IM a été utilisée pour synthétiser des lysophospholipides enrichis en CLA avec un rendement de 18%, de la PC a été synthétisée avec un rendement de 1,2% [211]. Cependant, ces résultats sont à nuancer du fait de la sélectivité des enzymes. Aucune étude ne s'intéresse à l'estérification directe du DHA sur la GPC. Seule l'étude menée par Lybert *et al.* [166] estérifie du DHA sur de la 2-palmitoyl-LPC et obtient un rendement en PC de 40% avec la lipase B de *Candida antarctica*.

3.2.2 Etude du rapport molaire

Le rapport molaire entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA a été étudié. En effet, dans cette étude, la réaction est réalisée en une seule étape en introduisant dans le mélange réactionnel l'ensemble des substrats de la réaction. Le plus souvent, il est observé dans la bibliographie pour l'obtention de phospholipides structurés par estérification, un procédé en deux étapes permettant l'obtention d'un lysophospholipide sur lequel une deuxième chaîne d'acide gras est greffée dans un second temps. Le choix s'est porté sur cette méthode en une étape car une des difficultés de ce travail est de solubiliser la GPC dans les acides gras mis en jeu dans la réaction. En effet, pour dissoudre la GPC dans le milieu réactionnel, il est nécessaire d'apporter une quantité d'énergie importante sous forme de chaleur dans le milieu risquant alors de dégrader

le DHA qui est fortement oxydable. L'ajout d'un antioxydant naturel, le sésamol, dans le milieu réactionnel limite ce phénomène. Dans ce travail, la GPC est dans un premier temps dissoute dans l'acide caprylique puis le DHA est ajouté dans un second temps. Ainsi, lors de la préparation du mélange réactionnel, le DHA n'a pas été exposé à des températures élevées, ce qui n'est pas le cas pour l'acide caprylique et la GPC.

Le rapport molaire GPC/AG est maintenu constant pour l'ensemble des expériences (1/18), seules les proportions entre l'acide caprylique et le DHA varient. La variation du rapport molaire entre la GPC et les acides gras n'a pas été étudiée. Le choix de ce rapport molaire s'appuie sur les savoirs théoriques acquis au cours de ce travail.

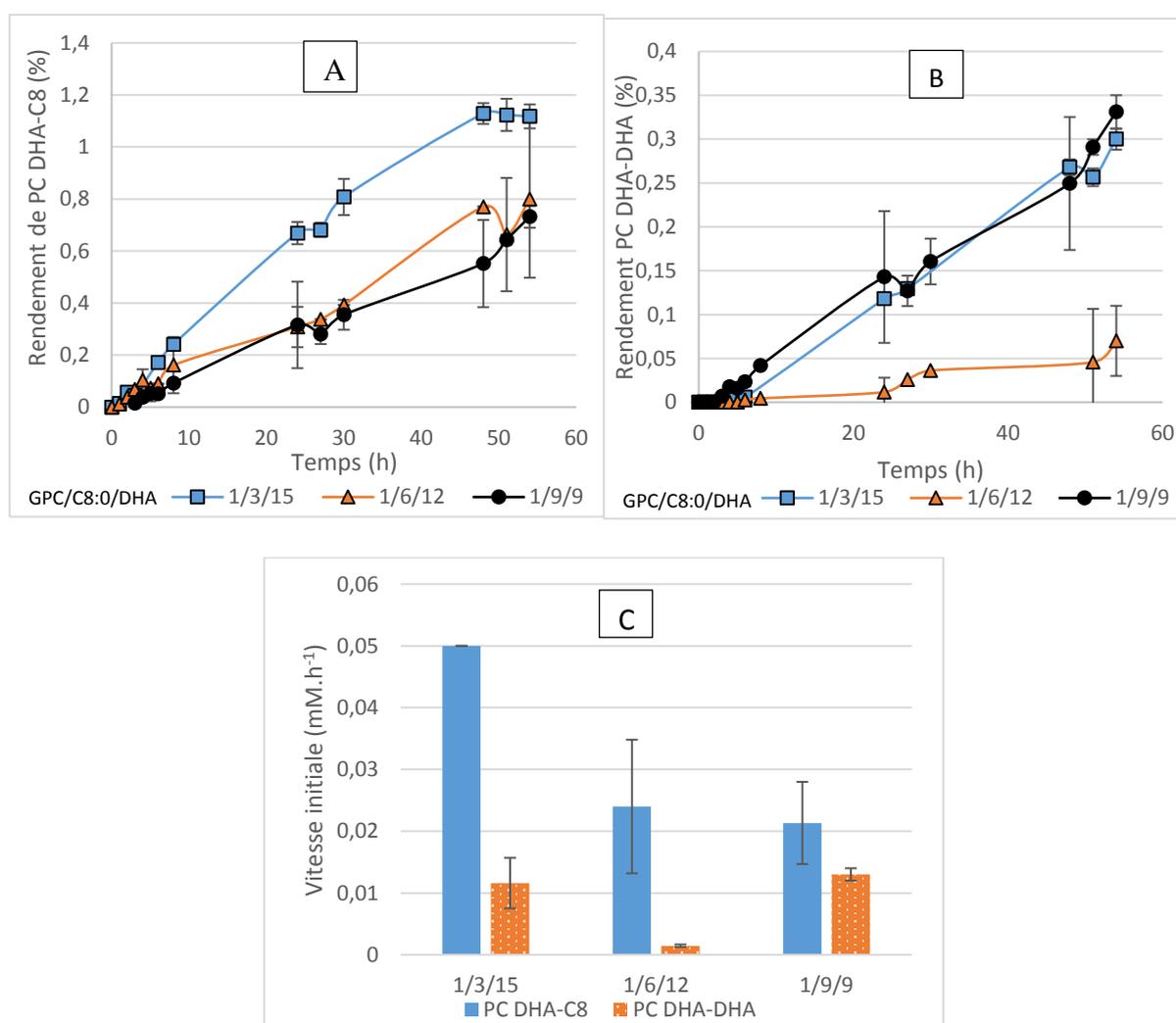


Figure 64 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et du DHA à différents rapports molaires (GPC/C8:0/DHA) (TL-IM, 45°C, 15% de la masse en substrat, 100 mbar)

La Figure 64 A montre les cinétiques de synthèse de PC DHA-C8 avec des rapports molaires de GPC/DHA/C8 de 1/3/15, 1/6/12 et 1/9/9. Un rendement à 54h de l'ordre de 1,2% est atteint

pour un rapport molaire de 1/3/15. Les rapports molaires où l'acide caprylique est plus fortement représenté (1/6/12 et 1/9/9) ne semblent pas être intéressants pour la synthèse de PC DHA-C8. Ainsi l'excès de DHA tendrait à améliorer les rendements de synthèse pour ce produit. Ces résultats sont également vérifiés en termes de vitesses initiales. Pour un rapport molaire de 1/3/15, la vitesse initiale de la réaction est de 0,05 mM.h⁻¹ pour les rapports molaires 1/6/12 et 1/9/9, cette vitesse est divisée par 2. Le rapport molaire 1/3/15 sera donc conservé pour les autres expériences.

La synthèse de PC DHA-DHA semblerait être meilleure soit quand le DHA est en excès (rapport molaire 1/3/15) ou quand les deux acides gras sont présents dans les mêmes quantités (1/9/9) (Figure 64 B). Le rendement de synthèse atteint 0,34 % pour un rapport molaire de 1/9/9 et 0,3% pour le rapport molaire 1/6/12. Cependant en termes de vitesses initiales (Figure 64 C), le rapport molaire 1/6/12 présente une valeur beaucoup plus faible (0,0014 mM.h⁻¹) que pour un rapport molaire 1/9/9 (0,013 mM.h⁻¹). Avec un rapport molaire de 1/0/18, il n'y a pas formation de PC DHA-DHA.

La Figure 65 A présente les cinétiques de la synthèse de LPC DHA. Il est mis en évidence que la présence d'acide caprylique dans le milieu réactionnel favorise la synthèse de LPC DHA. En effet, lorsque le rapport molaire GPC/C8:0/DHA est de 1/0/18, c'est-à-dire, quand l'acide caprylique est absent du milieu, le rendement est de 6%. Or, avec un rapport molaire de 1/3/15 (GPC/C8:0/DHA), le rendement est amélioré et atteint 11%. En revanche, lorsque l'acide caprylique est amené en plus grande quantité dans le milieu réactionnel (1/6/12 et 1/9/9), le rendement de synthèse ne dépasse pas 4%. La vitesse initiale de la réaction est également améliorée lorsqu'il y a présence d'acide caprylique dans le milieu qu'en son absence. Avec un rapport molaire 1/3/15, la vitesse initiale est de 2,2 mM.h⁻¹ contre 0,9 mM.h⁻¹ avec un rapport molaire 1/0/18. La présence d'acide caprylique permet de plus que doubler la vitesse initiale de la réaction. Ici, il pourrait jouer le rôle de solvant en permettant de diminuer la viscosité du milieu réactionnel. Il est important de rappeler que bien que le rendement soit de 11% avec un rapport molaire de 1/3/15 pour la lipase TL-IM, il reste néanmoins plus faible qu'avec Novozym 435 pour laquelle le rendement atteint les 16% (Partie III, paragraphe 3.2.1, Figure 63 A) et ce, sans optimisation.

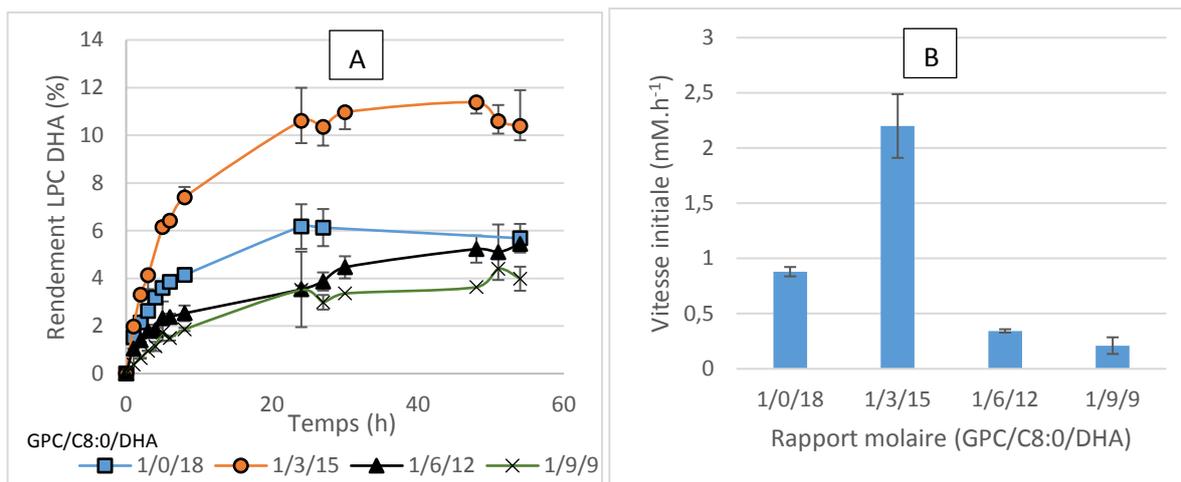


Figure 65 : Cinétiques (A) et vitesses initiales (B) de la production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA à différents rapports molaires (GPC/C8:0/DHA) (TL-IM, 45°C, quantité d'enzyme :15%, 100 mbar)

Hong *et al.* [144] ont étudié le rapport molaire lors de la synthèse LPC et PC à partir de GPC et CLA. Ils ont démontré que l'augmentation du rapport molaire (CLA/GPC) de 5 à 50 améliore le rendement de 35%. Pour la synthèse de PC, des rapports molaires jusqu'à 100 améliorent le rendement mais pas au-delà de 2,2%. Une autre étude, menée par Mnasri *et al.* [133] sur la synthèse d'oléyl-lysophosphatidylcholine met en avant qu'un rapport molaire (GPC/C18:1) de 1/20 est préférable à un rapport molaire plus élevé. En ce qui concerne le rendement de la synthèse de PC, il n'excède jamais 10% sur les rapports molaires élevés (1/20 et 1/50) étudiés. Cependant, ce travail met en avant que les rapports molaires faibles limitent la production de PC. Les résultats trouvés dans notre étude sont donc cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature.

3.2.3 Quantité d'enzyme

La quantité d'enzyme est un facteur non négligeable lors de l'étude d'une réaction de synthèse notamment lorsque l'enzyme est immobilisée, la préparation enzymatique peut adsorber les substrats et modifier la consistance du milieu. Il est donc difficile de maintenir les lipases immobilisées en suspension dans celui-ci. De plus, lorsque la quantité de préparation enzymatique est trop importante, les substrats s'adsorbent sur le support enzymatique et il devient difficile de suivre la réaction du fait de la consistance du milieu réactionnel, les prélèvements sont alors compliqués. Dans ce travail, 3 quantités d'enzyme ont été étudiées : 10%, 15% et 20% de la masse en substrat.

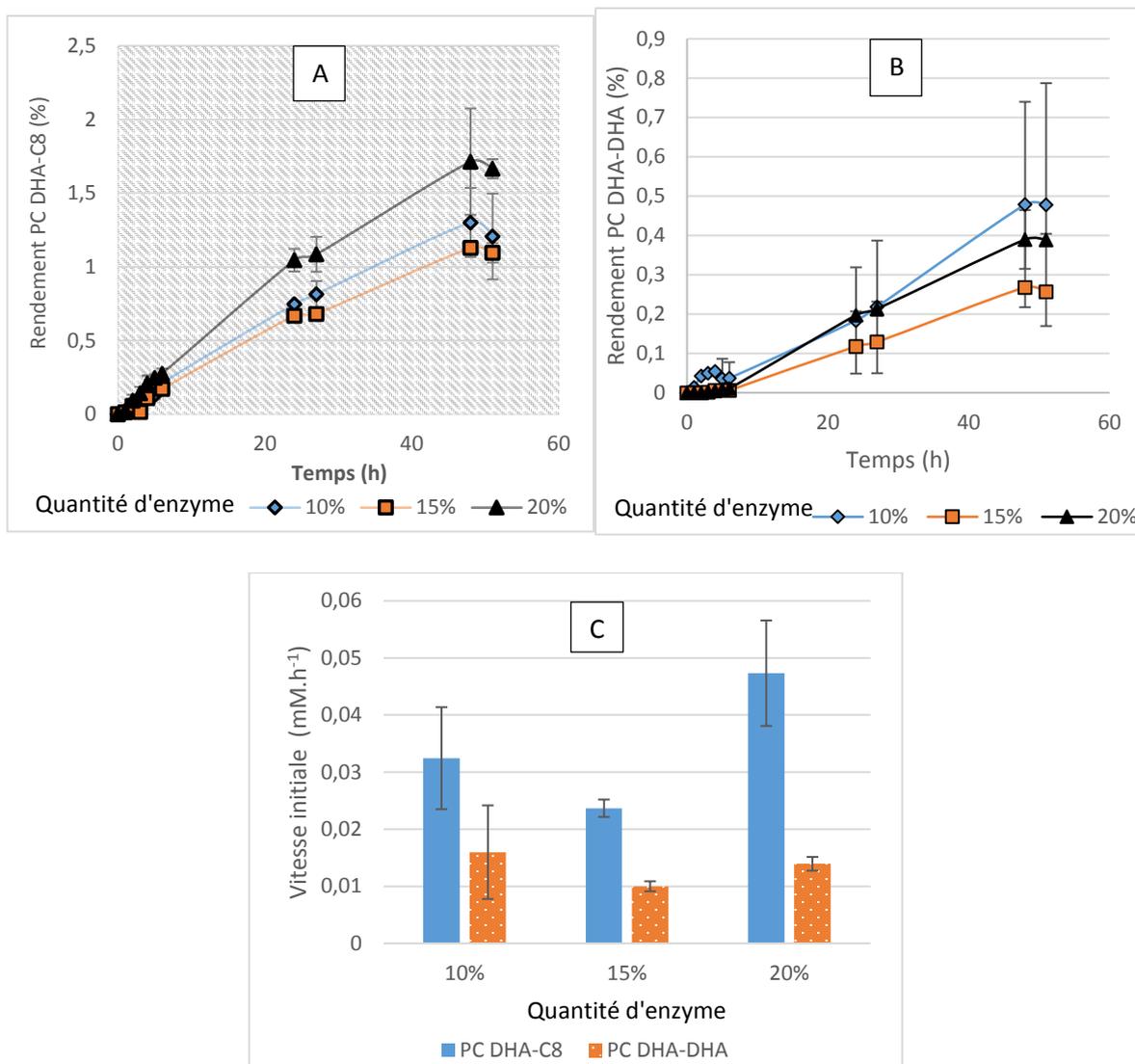


Figure 66 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (B) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes quantités d'enzyme (TL-IM, rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, 45°C, 100 mbar)

Sur la Figure 66 A, les cinétiques de synthèse de PC DHA-C8 sont étudiées. Cette figure met en avant que le rendement le plus important est obtenu avec 20 % d'enzyme et est de l'ordre de 2%. Une quantité plus élevée d'enzyme dans le milieu n'est pas envisageable pour des raisons pratiques puisqu'il devient difficile de réaliser les prélèvements. En termes de vitesses initiales (Figure 66 C), il est étonnant de constater que la vitesse initiale de la réaction est plus élevée lorsqu'il y a 10% d'enzyme que lorsqu'il y en a 15%, cependant au vu des barres d'erreur, ces résultats ne sont pas significatifs. Les barres d'erreurs importantes trouvent leur explication dans la difficulté de réalisation des prélèvements. La valeur la plus importante est toutefois attribuée à une quantité d'enzyme de 20% ce qui est cohérent avec la théorie.

La production de PC DHA-DHA est étudiée également en fonction du pourcentage d'enzyme dans le milieu réactionnel (Figure 66 B et C). Ces graphiques sont difficilement interprétables au vu des barres d'erreurs, d'autant plus que les résultats ne répondent pas à la théorie. En effet, il serait préférable selon la lecture de ces graphes de travailler avec 10% d'enzyme plutôt qu'avec 15%. Cependant, en considérant la variabilité, il est impossible de tirer des conclusions pour la production de PC DHA-DHA.

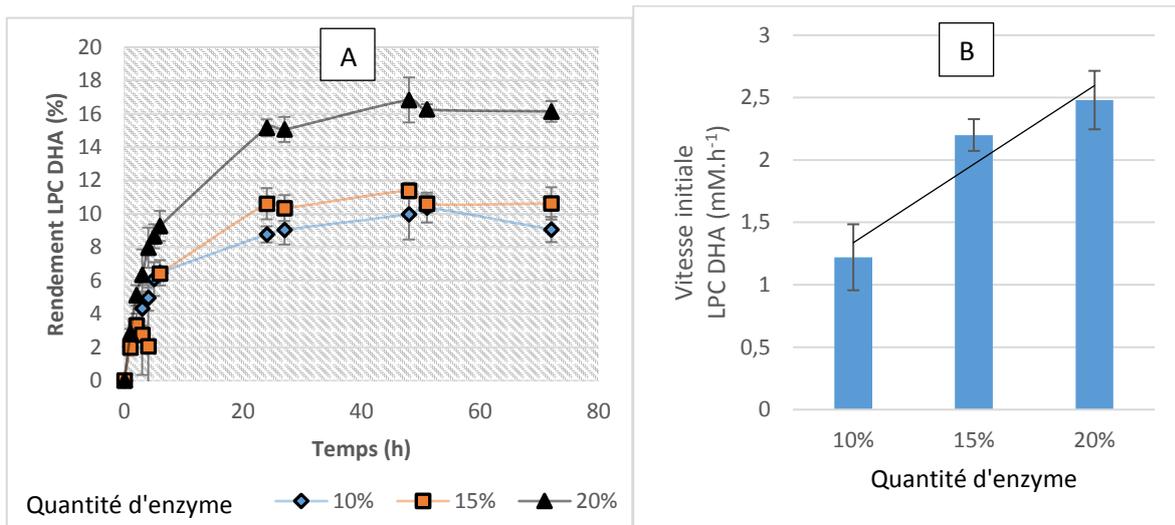


Figure 67 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (B) de la production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes quantités d'enzyme (TL-IM, Rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, 45°C, 100 mbar)

La Figure 67 présente les cinétiques (A) et les vitesses initiales (B) obtenues pour la LPC DHA. Contrairement aux résultats obtenus pour la PC DHA-C8 et la PC DHA-DHA, les vitesses initiales augmentent lorsque le pourcentage d'enzyme augmente, ce qui répond au savoir théorique. Il se dégage donc que la vitesse initiale est plus importante lorsque la réaction est réalisée en présence de 20% d'enzyme qu'avec des pourcentages en enzymes plus faibles. Le rendement de la réaction est amélioré pour une quantité d'enzyme de 20%. Pour les quantités d'enzyme de 10 et 15% de la masse en substrat, le rendement est de l'ordre de 10%.

Pour l'ensemble des produits synthétisés, la quantité d'enzyme la plus élevée (20% de la masse en substrat) permet d'obtenir les meilleurs rendements et les vitesses initiales les plus importantes. Ainsi, pour la suite de l'étude, une quantité d'enzyme de 20% de la masse en substrat sera utilisée.

Dans l'étude de Mnasri et al [133], la quantité d'enzyme est fixée à 10%, il y est mentionné les difficultés d'agitation liées au milieu. Dans notre cas, la quantité d'enzyme peut être de 20%,

en effet, l'acide caprylique est beaucoup moins visqueux que l'acide oléique avec lequel ces auteurs travaillent.

3.2.4 Etude de l'effet du vide

Lors de réactions d'estérifications, un des produits de la réaction est l'eau. La production d'eau au cours de la réaction pose problème car celle-ci abaisse le rendement de synthèse en conduisant à une réaction d'hydrolyse. Il est donc important d'ôter l'eau tout au long de la réaction afin d'améliorer les rendements de synthèse. Aussi, dans ce cadre, l'évaporation de l'eau est réalisée par l'application d'un vide. L'étude de l'effet du vide sur la réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA a été réalisée.

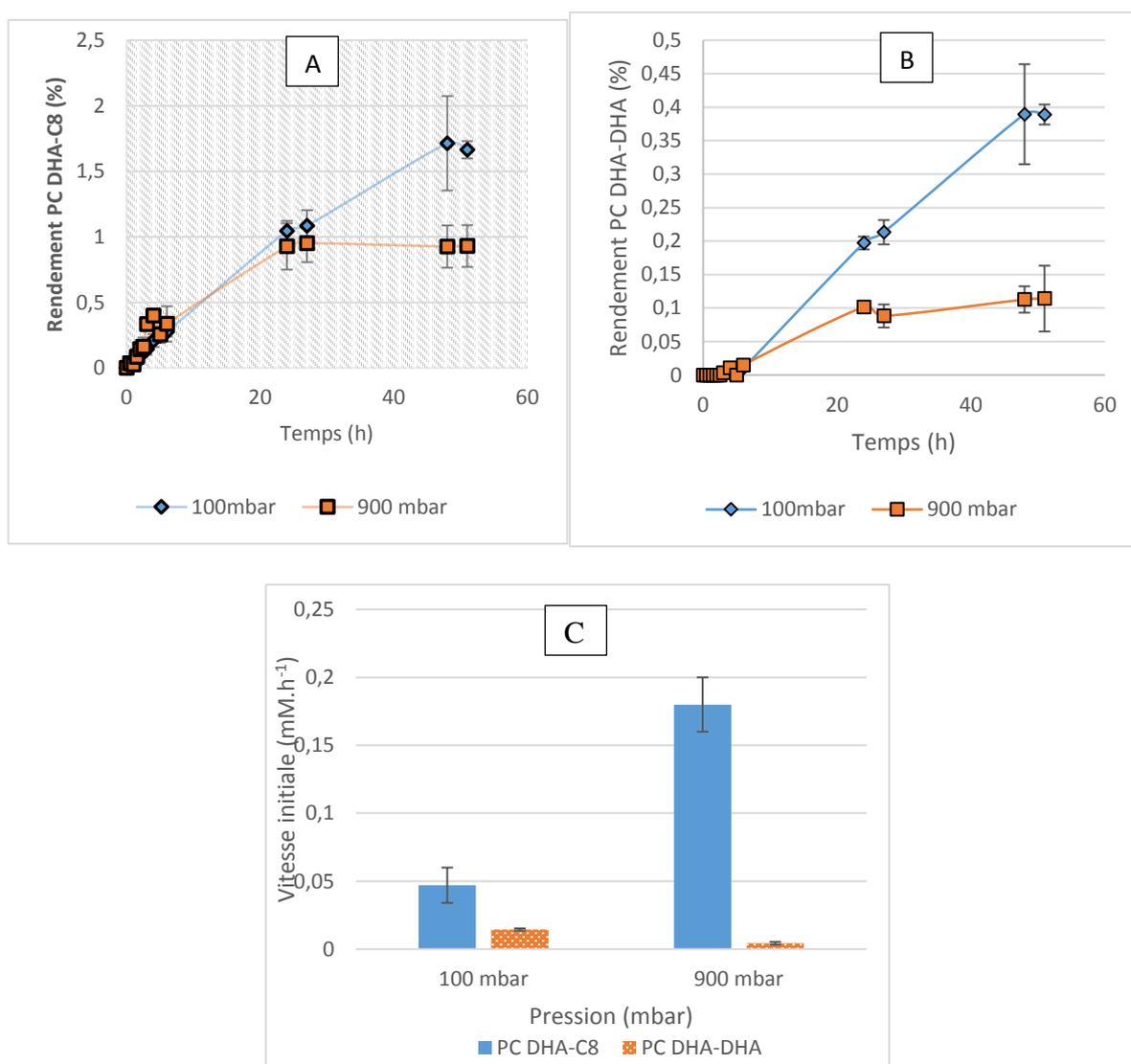


Figure 68 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA avec et sans vide (TL-IM, rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, quantité d'enzyme : 20%, 45°C)

Pour la synthèse de PC DHA-C8, la mise sous vide du réacteur enzymatique (100 mbar) tend à améliorer légèrement le rendement de synthèse par rapport à une pression plus élevée (900 mbar). En effet, un rendement de 1,7% est atteint en 54h avec une pression de 100 mbar contre 1% pour une pression de 900 mbar (Figure 68 A). Cependant, en termes de vitesses initiales de la réaction, une pression de 900 mbar permet d'atteindre une vitesse initiale de 0,18 mM.h⁻¹ contre 0,047 mM.h⁻¹ pour une pression de 100 mbar. Ainsi, le fait d'ôter l'eau du milieu diminue l'activité enzymatique (Figure 68 C). En effet, les lipases ont besoin d'un seuil minimal d'hydratation permettant ainsi l'activation interfaciale. L'application d'un vide modifierait donc l'activité de l'eau et limiterait l'action de l'enzyme sur ses substrats. Cependant, si la réaction est moins rapide avec l'application d'un vide, il n'en reste pas moins que le rendement est doublé. En effet, les courbes se superposent pendant 24h mais après, pour une pression de 900 mbar, la cinétique atteint un plateau ce qui n'est pas le cas pour une pression de 100 mbar.

Pour l'obtention de phospholipides par estérification, l'application d'un vide améliore les rendements de synthèse, bien qu'ils restent très faibles. Ainsi, l'application d'une pression de 100 mbar (0,4%) améliore le rendement par rapport à une pression de 900 mbar (0,12%) (Figure 68B). La vitesse initiale de la réaction de synthèse de PC DHA-DHA, bien que très faible, est beaucoup plus importante lorsqu'un vide est appliqué ; elle est plus que doublée (Figure 68 C).

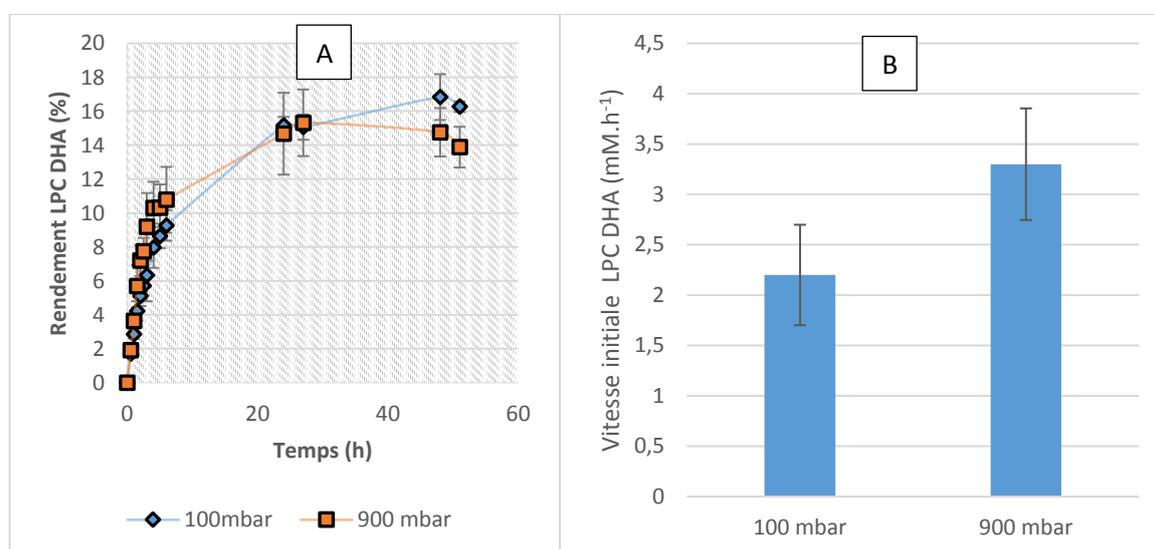


Figure 69 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (B) de production de LPC DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA avec et sans vide (TL-IM, rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, quantité d'enzyme=20%, 45°C)

En ce qui concerne la LPC DHA, l'application d'un vide à 100 mbar n'améliore pas la synthèse. Le rendement obtenu est de 16% avec une pression de 900 mbar et de 14% avec une pression

de 100 mbar, la différence de rendement observée n'est pas significative (Figure 69 A). En termes de vitesses initiales, les faibles pressions diminuent celles-ci. La vitesse initiale n'est que de $2,2 \text{ mM.h}^{-1}$ tandis qu'avec des pressions élevées, la vitesse initiale de la réaction est de $3,3 \text{ mM.h}^{-1}$ (Figure 69 B). Il pourrait être intéressant d'étudier la réaction avec des pressions comprises entre 100 et 900 mbar pour limiter l'évaporation de l'eau du milieu réactionnel et maintenir la lipase suffisamment hydratée pour optimiser la vitesse initiale.

Hong *et al.* [144] ont étudié l'effet de vide sur l'estérification de la GPC et de l'acide linoléique conjugué (CLA). Pour la synthèse de LPC et de PC, un vide de 1 mmHg est souhaitable et améliore les rendements. Ils obtiennent un rendement de 70% pour la LPC et de 3% pour la PC. Pour une pression de 0,5 mmHg ou de 100 mmHg, le rendement est diminué et atteint 1% pour la PC, ce n'est pas le cas pour la synthèse de LPC. Leur travail met en évidence que les rendements de PC sont de 3% pour une pression de 1 mmHg. Cette étude suggère donc qu'il serait intéressant d'étudier notre réaction avec des pressions inférieures à 100 mbar (= 75 mmHg).

3.2.5 Etude de la température

Les lipases peuvent être dénaturées lorsque la température est trop élevée et lorsque la température est trop faible, la lipase est inactive car l'énergie d'activation n'est pas suffisante. Dans la mesure où ce travail est réalisé avec un AGPI, il faut également noter que plus la température est importante, plus les risques d'oxydation de cet AGPI augmentent. Enfin pour finir, plus la température augmente, plus il y a de migration des chaînes acylées au sein de la molécule. Cependant, ce point n'est pas étudié dans ce travail.

Augmenter la température permet de diminuer la viscosité du milieu, cela peut donc améliorer l'agitation de la préparation enzymatique et améliorer la vitesse initiale de la réaction.

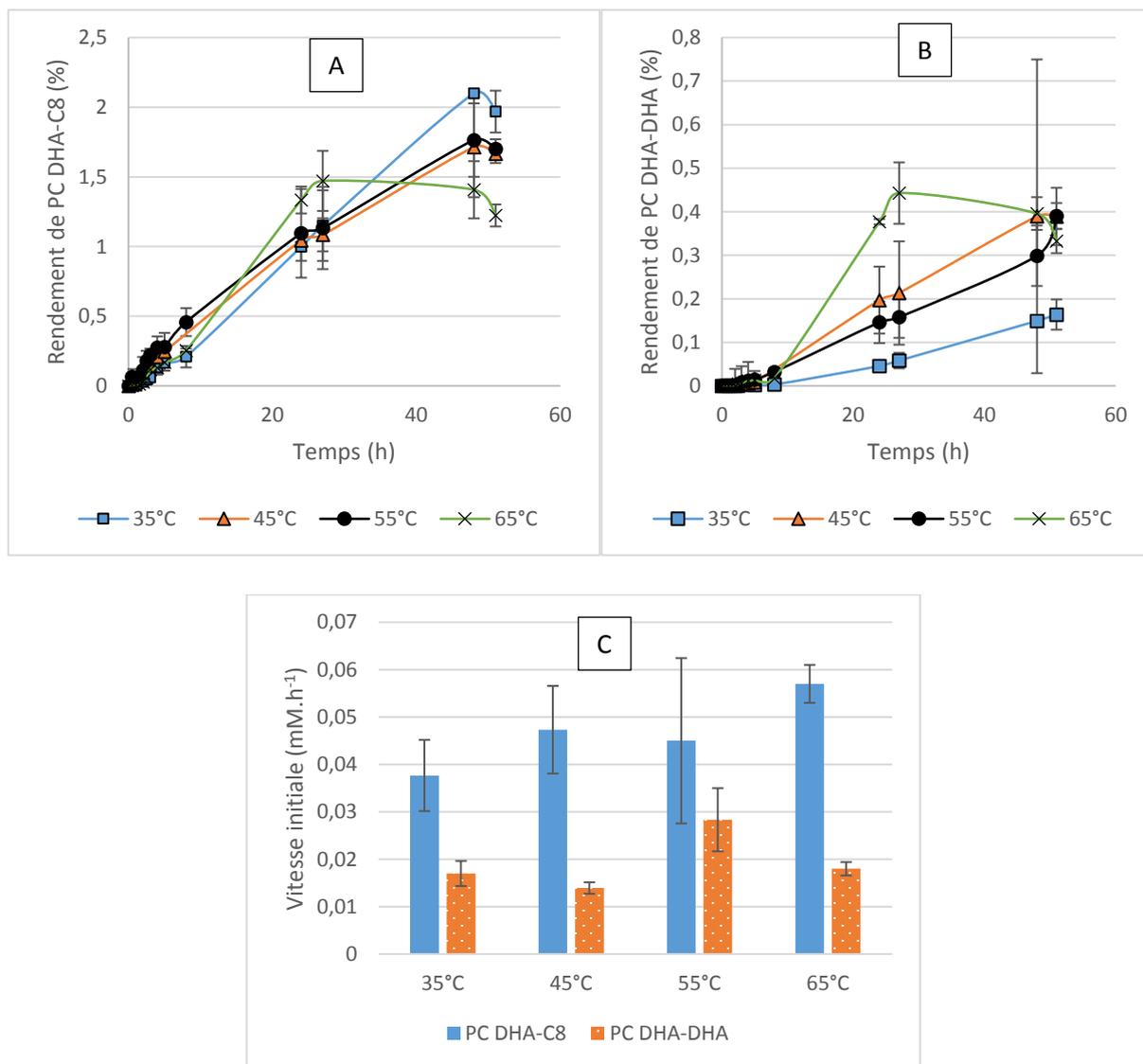


Figure 70 : Cinétiques (A et B) et vitesses initiales (C) de la production de PC DHA-C8 et PC DHA-DHA lors de l'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes températures (TL-IM, rapport molaire GPC/C8:0/DHA=1/3/15, quantité d'enzyme : 20%, 100 mbar)

Pour la synthèse de PC DHA-C8, il n'y a pas d'effet marqué de la température sur les rendements de synthèse. Il y aurait une très légère tendance à la diminution du rendement lorsque les températures excèdent 35°C. En effet, pour une température de 35°C, le rendement est de 2% en 54 h. Pour des températures comprises entre 45 et 55°C, ce rendement est de 1,7%. Pour une température de 65°C, un plateau est atteint en 24h et le rendement ne dépasse pas 1,5% (Figure 70 A). En termes de vitesses initiales (Figure 70 C), la température n'influence pas cette réponse. De plus, il est difficile de tirer des conclusions au vu de la variabilité de la réponse sur ces graphiques. Le travail à faible température est un plus d'un point de vue économique car le poste de dépense énergétique diminue. De plus, une faible température est préférable pour limiter l'oxydation du DHA.

Pour la synthèse de PC DHA-DHA (Figure 70 B), les rendements sont semblables entre 45°C et 65°C, il n'y a pas de différence notable dans les résultats obtenus. Une température de 35°C cependant semble abaisser ce rendement. En termes de vitesses initiales (Figure 70 C), il n'y a pas de résultats prépondérants. Une température de 55°C tendrait à améliorer la vitesse initiale de la réaction.

Il apparaît sur la Figure 71 A que, plus la température de la réaction augmente, moins le rendement en LPC DHA est important. Ainsi, pour une température de 35°C, le rendement est de 16,7% contre 11% pour une température de 65°C. La vitesse initiale de la réaction (Figure 71 C) la plus importante est obtenue pour une température de 55°C (3 mM.h⁻¹). Celle-ci diminue lorsque la température diminue. Une température de 65°C ralentit la vitesse de réaction à 1,4 mM.h⁻¹. La lipase semble donc être moins efficace à cette température.

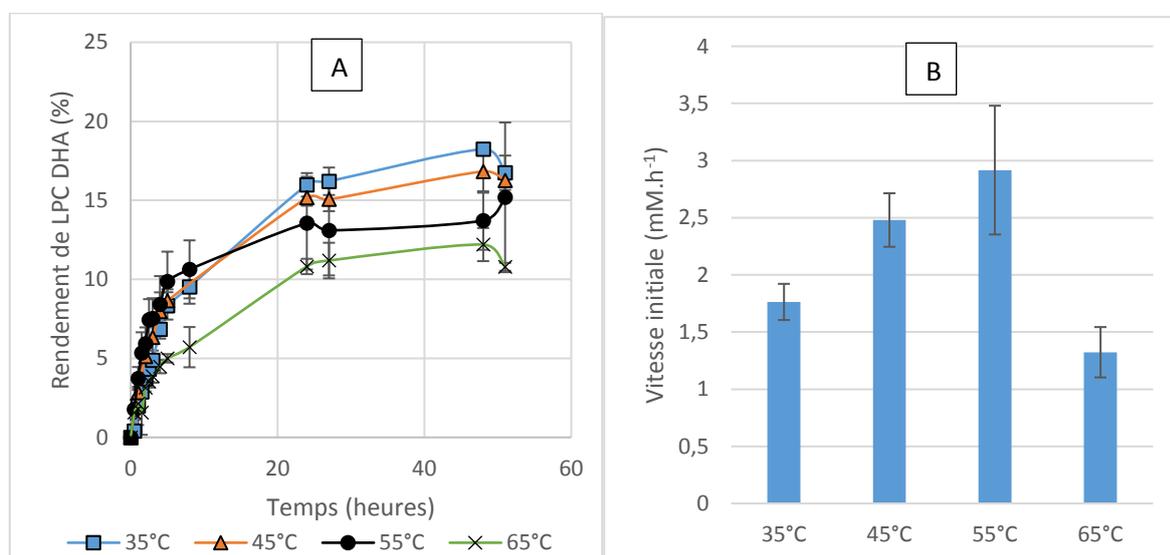


Figure 71 : Cinétiques (A) et vitesses initiales (B) de production de LPC DHA obtenu par réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA pour différentes quantités d'enzyme (TL-IM, rapport molaire GPC/C8:0/DHA= 1/3/15, 20% d'enzyme, 100 mbar)

Ce travail a mis en évidence que malgré l'étude de plusieurs paramètres, les rendements en PC DHA-C8 restent excessivement faibles. La faisabilité de la réaction a été démontrée mais cela laisse encore place à l'amélioration. L'utilisation de solvants « verts » tels que les liquides ioniques ou l'application d'un vide plus important pourraient améliorer ce rendement.

Pour synthétiser de la PC DHA-C8, l'application d'un vide est nécessaire et permet de doubler les rendements de synthèse. La température 35°C permet d'obtenir des rendements supérieurs à ceux obtenus pour des températures plus élevées, cependant, des températures plus faibles n'ont pas été testées. Le rapport molaire entre le DHA et l'acide caprylique est un élément

important de cette synthèse, si trop d'acide caprylique est présent dans le milieu réactionnel, le rendement de synthèse diminue. Il a été mis en évidence également, que plus la quantité d'enzyme est importante, meilleur est le rendement. Dans le cadre de cette manipulation, il n'était pas possible d'aller au-delà de 20% d'enzyme pour des raisons techniques. Cependant, il pourrait être envisageable d'améliorer les rendements en utilisant le principe d'un bioréacteur à lit fluidisé. Le lit fluidisé permettrait d'améliorer la mise en contact des substrats avec la lipase. En effet, avec le système d'agitation utilisé dans cette étude, l'agitation est moindre lorsque la quantité d'enzyme excède 20% de la masse en substrat.

La LPC DHA est le produit principal de cette réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA. Un rendement de 16,7% a été atteint sans optimisation, en effet, la réponse étudiée dans ce travail est le rendement en PC DHA-C8. Il est intéressant de constater que l'ajout d'un AGCM dans le milieu en améliore la synthèse. Il a été démontré que l'application du vide n'est pas nécessaire pour la synthèse de LPC DHA. Il serait intéressant de tester différentes activités de l'eau pour améliorer le rendement de cette synthèse. Tout comme pour la synthèse de PC DHA-C8, l'utilisation d'un bioréacteur à lit fluidisé, permettrait d'augmenter les rendements de synthèse améliorant le contact entre les enzymes et les substrats. Il est important de noter que le choix de la lipase aurait été différent si l'objectif avait été de synthétiser de la LPC DHA. En effet, Novozym 435 permet d'atteindre un rendement de 16% sans optimisation contre 11 % pour TL-IM (Figure 63 B).

Il n'a pas été envisagé dans cette étude de réaliser la synthèse de PC DHA-C8 en deux étapes, soit la synthèse d'une LPC DHA puis l'estérification sur celle-ci d'un C8:0. Ces techniques sont le plus souvent appliquées, cependant les exemples trouvés dans la bibliographie se font toujours dans un milieu solvaté permettant d'atteindre des rendements de l'ordre de 45 à 65% en PC lorsque ce sont des AGPI qui sont greffés dans un second temps [166].

Par le procédé en une étape, le meilleur rendement obtenu pour la synthèse de PC C18:1-C18:1 est de 10%, le rendement en LPC C18:1 étant de 75% avec la lipase RM-IM [133]. RM-IM a également été utilisée pour estérifier de l'acide linoléique conjugué (CLA) sur de la GPC. Ces réactions ont été réalisées en milieu fondu avec l'application d'une pression de 1 mmHg, le rendement en LPC CLA était de 15% et en PC CLA-CLA de 2,5% [144]. Mnasri *et al.* ont obtenu un rendement de LPC DHA de 30% en utilisant la lipase RM-IM, sans donner d'information sur la synthèse de PC DHA-DHA. L'analyse par spectrométrie des LPC DHA obtenues (partie III, paragraphe 1.2.3) a mis en évidence que ce sont des 1-LPC DHA qui sont

synthétisées. La 1-LPC DHA est privilégiée pour l'apport du DHA au cerveau [212]. Ainsi, il serait intéressant de développer par la suite cette méthode de synthèse de LPC DHA [168].

Conclusion et perspectives

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le cadre de la synthèse enzymatique de phospholipides structurés enrichis en DHA et acide caprylique (PC DHA-C8). Cette étude s'inscrit dans un contexte favorable d'intérêt pour les phospholipides structurés enrichis en AGPI. D'autre part, la valorisation de produits d'origine végétale bénéficie d'une image positive vis-à-vis des consommateurs par rapport aux produits d'origine animale. La valorisation de DHA issu de microalgues semble donc tout à fait appropriée pour satisfaire la demande croissante pour cet acide gras. L'approche enzymatique de cette synthèse est également un point fort, les enzymes limitant l'utilisation de produits nocifs pour la santé et l'environnement. Le travail s'intéresse aux lipases immobilisées qui peuvent être réutilisées pour réaliser un nouveau cycle de synthèse, les réactions peuvent être menées dans des conditions douces qui aident à conserver les propriétés des phospholipides et des acides gras qui peuvent se montrer sensibles aux conditions de synthèse chimique.

Deux méthodes analytiques en HPLC-DEDL-UV ont été développées afin de doser les molécules synthétisées dans les deux réactions enzymatiques étudiées. La première méthode développée permet de suivre la réaction d'acidolyse par analyse et quantification des acides gras libérés par la réaction. Une colonne Poroshell-120 (phase inverse) par le biais d'un gradient de solvant composé d'eau et de méthanol supplémentés en TFA permet la quantification de 10 acides gras et l'identification des phospholipides structurés synthétisés. C'est lors du développement de cette méthode que les paramètres du DEDL ont été déterminés pour les deux méthodes analytiques. La deuxième méthode a été développée sur une colonne en phase HILIC pour le suivi de la réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA. Cette méthode permet la quantification de la PC DHA-C8, la LPC DHA et la PC DHA-DHA.

L'extraction solvatée des phospholipides de la microalgue *Tisochrysis lutea*, pratiquée à l'aide d'une sonde à ultrasons, a fait l'objet d'une optimisation par la méthode des plans d'expériences. Le plan d'expériences a permis de déterminer les réglages des paramètres de la sonde de sonication. Les solvants les plus indiqués pour cette extraction sont le méthanol et le chloroforme. L'analyse des lipides de *Tisochrysis lutea* a mis en évidence que le DHA était retrouvé à hauteur de 45,2% dans la fraction phospholipidique. Cependant, les phospholipides ne représentent que 10% des lipides totaux. 43,5 % du DHA total est retrouvé dans les phospholipides. Les lipides neutres sont les plus abondants (57,8%). Les glycolipides sont retrouvés à hauteur de 33,8%. La technique d'extraction utilisée est très polluante avec l'utilisation de solvants organochlorés. De plus, dans le cadre de l'utilisation de la PC DHA-C8 dans le domaine alimentaire ou pharmaceutique, l'utilisation de ces solvants pose problème.

L'utilisation d'une extraction par fluide supercritique permettrait d'obtenir des extraits purs sans résidus de solvants. L'extraction par eau sub-critique pourrait également être envisagée pour l'extraction des molécules moyennement polaires telles que les phospholipides. Enfin, les liquides ioniques seraient également une alternative à l'utilisation de solvants organochlorés.

La réaction d'acidolyse a été étudiée dans un premier temps sur un phospholipide modèle, la phosphatidylcholine de tournesol. En effet, ces phosphatidylcholines sont commercialisées et présentent 3 acides gras principaux tout comme les phospholipides microalgaux (la nature de ces acides gras n'est pas la même). Dans un premier temps, un criblage enzymatique a permis de déterminer que la lipase TL-IM était la plus apte à synthétiser le produit attendu à savoir la PC C18:2-C8. Dans un second temps, un bornage des paramètres de la réaction, permettant de définir les paramètres les plus influents, a été réalisé. Le rapport molaire, la quantité d'enzyme, l'activité de l'eau et la température ont été étudiés. Suite à ce bornage, un plan d'expériences pour étudier la réaction d'acidolyse entre la phosphatidylcholine de tournesol et l'acide caprylique a été mis en œuvre. Ce plan d'expériences basé sur deux réponses : la vitesse initiale de la réaction et la production de PC C18:2-C8 à 54h, a permis l'étude des interactions et l'influence des deux facteurs sélectionnés lors du bornage, à savoir : la température et l'activité de l'eau. Une quantité de PC C18:2-C8 maximale a été obtenue pour une température de réaction de 38°C et une activité de l'eau de 0,7. Les paramètres définis lors de ce plan d'expériences ont ensuite été appliqués à la réaction d'acidolyse entre l'acide caprylique et les phospholipides microalgaux. Cette réaction n'a pas permis de mettre en évidence la production de PC DHA-C8. Cela pourrait être lié à la présence d'un inhibiteur de la lipase dans l'extrait microalgal mais aussi à la non-détection de la molécule par la méthode analytique développée. En effet, l'échantillon de phospholipides microalgaux est très complexe et le nombre de pics apparaissant sur le chromatogramme peut gêner la lecture du chromatogramme après acidolyse, ne permettant pas de visualiser le pic d'intérêt. L'utilisation d'une UHPLC-MS pour l'analyse des échantillons de synthèse pourrait permettre une séparation des molécules plus efficace ainsi que la détection de la molécule d'intérêt.

Afin de vérifier l'hypothèse concernant la présence d'un inhibiteur dans les lipides microalgaux, il serait intéressant d'étudier la réaction avec un substrat issu d'une autre source de phospholipides naturellement riches en DHA telle que les phospholipides de krill. Un système permettant de maintenir une activité de l'eau constante tout au long de la réaction serait un plus pour ce genre d'étude. En effet, lors de l'étude des résultats obtenus par le plan d'expériences avec pour réponse les vitesses initiales de réactions, les paramètres optimaux sont

différents de ceux obtenus pour la quantité de PC C18:2-C8 à 54h et tendent à démontrer qu'une température supérieure à 55°C et une activité de l'eau inférieure à 0,5 permettraient d'obtenir des vitesses initiales plus élevées. Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par le fait que l'activité de l'eau n'est pas contrôlée durant la totalité de la réaction mais seulement au début.

Le produit de l'acidolyse des phospholipides de tournesol, la PC C18:2-C8, peut-être valorisée dans l'industrie alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique pour ses propriétés émulsifiantes augmentées par la présence d'acide caprylique. Il serait intéressant de diversifier les sources de phospholipides pour valoriser ce travail, en testant les conditions obtenues sur un nouveau substrat tel que les phospholipides de colza ou des lécithines déshuilées dont les coûts sont moindres.

La réaction d'estérification entre la GPC, l'acide caprylique et le DHA a été étudiée dans un second temps. L'optimisation de la synthèse de PC DHA-C8 a été menée par la méthode dite de un facteur à la fois. Les facteurs étudiés étaient la nature de la lipase, le rapport molaire, la quantité d'enzyme, l'effet du vide et la température. A l'issue de cette étude, la lipase TL-IM a été retenue, une température de 45°C, une quantité d'enzyme de 150 mg pour 1 g de substrat, un rapport molaire GPC/C8:0/DHA de 1/3/15 et l'application d'un vide sont les paramètres optimaux pour la synthèse de PC DHA-C8. Cependant, il a été observé que le produit majoritairement formé parmi la PC DHA-C8, la PC DHA-DHA et la LPC DHA est la LPC DHA. En effet, dans les conditions optimales pour la synthèse de PC DHA-C8, le rendement de ce produit est de 2% contre 14% pour la LPC DHA. Le rendement en PC DHA-DHA atteint quant à lui 0,51% en 54h. Les molécules synthétisées par cette réaction d'estérification ont été purifiées puis caractérisées par UHPLC-MS.

Malgré les faibles concentrations obtenues, la réaction d'estérification a permis d'obtenir de la PC DHA-C8. A l'avenir, il serait intéressant d'étudier l'application d'un vide inférieur à 100 mbar sur la réaction. Afin de rester dans des conditions de réaction exemptes de solvant, l'ajout d'un acide gras ayant une viscosité moins importante que l'acide caprylique, tel que l'acide butyrique, pourrait également améliorer ce rendement, en rendant possible une agitation plus efficace. Il peut également être envisagé, un ajout, après formation de la LPC DHA, d'un ester vinylique d'acide caprylique dans le milieu réactionnel pour favoriser la formation de PC DHA-C8. En parallèle, cette étude a permis de démontrer que la synthèse de LPC DHA était possible par le biais du génie enzymatique et que la présence d'un AGCM dans le milieu réactionnel améliorait le rendement de synthèse. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'un autre acide gras sur le rendement de LPC DHA. Si le rapport molaire entre l'acide caprylique et le DHA a

été étudié, le ratio GPC/AG n'a pas été optimisé au cours de ce travail. C'est un point qu'il serait intéressant de développer dans un travail ultérieur. Les rendements de synthèse en LPC DHA, bien qu'importants, sont inférieurs à ceux retrouvés dans la bibliographie. Il faut noter que lors de ce travail, le rendement en LPC DHA n'a pas été optimisé puisque c'est la synthèse de PC DHA-C8 qui importait.

Références

1. Blondeau N, Schneider SM. Les acides gras essentiels de la famille des oméga-3 et la santé de la mère et de l'enfant. *Nutr Clin Metab.* 2006;20(2):68-72.
2. Cuvelier C, Cabaraux J-F, Dufrasne I, Hornick J-L, Istasse L. Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. *Ann Med Vet.* 2004;148(3):133-140.
3. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:345-76.
4. Alessandri J-M, Extier A, Astorg P, Lavialle M, Simon N, Guesnet P. Métabolisme des acides gras oméga-3 : différences entre hommes et femmes. *Nutr Clin Métab.* 2009;23(2):55-66.
5. St-Onge M-P, Bosarge A, Goree LLT, Darnell B. Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(5):547-552.
6. Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J. Medium-chain triglycerides. *Int Dairy J.* 2006;16(11):1374-1382.
7. Rodriguez M, Funke S, Fink M, Demmelmair H, Turini M, Crozier G, Koletzko B. Plasma fatty acids and [^{13}C]linoleic acid metabolism in preterm infants fed a formula with medium-chain triglycerides. *J Lipid Res.* 2003;44(1):41-48.
8. Ezanno H, Beauchamp E, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver. *Eur J Lipid Technol.* 2014;117(3):281-290
9. Lemarié F, Cavalier J-F, Garcia C, Boissel F, Point V, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Effect of preduodenal lipase inhibition in suckling rats on dietary octanoic acid (C8:0) gastric absorption and plasma octanoylated ghrelin concentration. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861:1111-1120.
10. Ezanno H, Beauchamp E, Lemarié F, Legrand P, Rioux V. L'acylation des protéines : une fonction cellulaire importante des acides gras saturés. *Nutr Clin Métab.* 2013;27(1):10-19.
11. Petit V, Niot I, Poirier H, Besnard P. Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes. *Nutr Clin Métab.* 2007;21(1):38-45.
12. Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L. A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B. and Barelli, H. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science.* 2014;345(6197):693-697.
13. Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32(4):619-634.
14. Berry KAZ, Gordon WC, Murphy RC, Bazan NG. Spatial organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2014;55(3):504-15.
15. Retterstol K, Haugen TB, Tran TN, Christophersen BO. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction.* 2001;121(6):881-887.

16. Fraser T, Tayler H, Love S. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2010;35(3):503-513.
17. Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *The Lancet.* 1978;2(8081):117-119.
18. Valencak TG, Gamsjäger L, Ohrnberger S, Culbert NJ, Ruf T. Healthy n-6/n-3 fatty acid composition from five European game meat species remains after cooking. *BMC Res Notes.* 2015;8(1):273.
19. Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res.* 2001;40(1-2):1-94.
20. Al MD, Van Houwelingen AC, Kester ADM, Hasaart THM, De Jong AEP, Hornstra G. Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *Br J Nutr.* 1995;74(01):55-68.
21. Lapillonne A. DHA et développement du cerveau de l'enfant. *OCL.* 2007;14(1):25-27.
22. SanGiovanni JP, Berkey CS, Dwyer JT, Colditz GA. Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Hum Dev.* 2000;57(3):165-188.
23. Heird WC, Lapillonne A. The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr.* 2005;25(1):549-571.
24. Vidailhet M. Omega 3: is there a situation of deficiency in young children?. *Arch Pediatr.* 2007;14(1):116-123.
25. Mulder KA, King DJ, Innis SM. Omega-3 fatty acid deficiency in infants before birth identified using a randomized trial of maternal DHA supplementation in pregnancy. *PLoS ONE.* 2014;9(1):e83764.
26. Olsen SF. Is supplementation with marine omega-3 fatty acids during pregnancy a useful tool in the prevention of preterm birth? *Clin Obstet Gynecol.* 2004;47(4):768-774.
27. Picone O, Marszalek A, Servely J-L, Chavatte-Palmer P. Influence d'une supplémentation en omégas 3 au cours de la grossesse. *J Gynécol Obst Bio R.* 2009;38(2):117-124.
28. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6):S1467-S1476.
29. Green JT, Orr SK, Bazinet RP. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing DHA from brain phospholipids. *J Lipid Res.* 2008;49(5):939-944.
30. Bazan NG, Molina MF, Gordon WC. DHA signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr.* 2011;31(1):321-351.
31. Dallongeville J, Marecaux N, Amouyel P. Acides gras oméga-3 et risque cardiovasculaire. *Ol Corps Gras Lipides.* 2010;17(4):232-235.
32. Affane F, Boukhari Benahmed Daidj N, Louala S, Munezero AN, Lamri-Senhadj MY. Effets d'un régime obésogène enrichi en coproduits de sardine sur les facteurs de risque pro-athérogènes, chez le rat Wistar. *Ann Cardiol Angéiol.* 2016;65(3):214-218.

33. Morin C, Rousseau E, Blier PU, Fortin S. Effect of DHA monoacylglyceride on systemic hypertension and cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(1):H93-H102.
34. Kim HY, Bigelow J, Kevala J. Substrate preference in phosphatidylserine biosynthesis for docosahexaenoic acid containing species. *Biochemistry*. 2004;43: 1030–1036.
35. Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim H-Y. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(31):10858-10863.
36. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002;21(6):495-505.
37. Guesnet P, Alessandri J-M, Vancassel S, Denis I, Laviolle M. Acides gras oméga 3 et fonctions cérébrales. *Nutr Clin Métab*. 2005;19(3):131-134.
38. Heras-Sandoval D, Pedraza-Chaverri J, Pérez-Rojas JM. Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):13-61.
39. Janssen CIF, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res*. 2014;53(1):1-17.
40. Astorg P, Couthouis A, Bertrais S, Arnault N, Meneton P, Guesnet P, Alessandri JM, Galan P, Hercberg S. Association of fish and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intakes with the occurrence of depressive episodes in middle-aged french men and women. *Prostag Leukotr Ess*. 2008;78(3):171-182.
41. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*. 1999;160(1):1-12.
42. Hibbeln JR, Bissette G, Umhau JC, George DT. Omega-3 status and cerebrospinal fluid corticotrophin releasing hormone in perpetrators of domestic violence. *Biol Psychiatry*. 2004;56(11):895-897.
43. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. 2017;355(6331):1330-1334.
44. Albin A, Cavuto S, Apolone G, Noonan DM. Strategies to prevent “bad luck” in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(10):dju213.
45. Gerber M. Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. *Br J Nutr*. 2012;107(2 Suppl):S228-S239.
46. Chamras H, Ardashian A, Heber D, Glaspy JA. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *J Nutr Biochem*. 2002;13(12):711-716.
47. Szymczak M, Murray M, Petrovic N. Modulation of angiogenesis by ω -3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood*. 2008;111(7):3514-3521.
48. Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D'Eliseo D, Velotti F. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acid DHA: A potential adjuvant in the treatment of cancer. *BioMed Res Int*. 2013;2013:e310186.

49. Gleissman H, Segerström L, Hamberg M, Ponthan F, Lindskog M, Johnsen JI, Kogner P. Omega-3 fatty acid supplementation delays the progression of neuroblastoma *in vivo*. *Int J Cancer*. 2011;128(7):1703-1711.
50. Bougnoux P, Poncheville L de, Germain E, Cognault S, Montharu J, Aubourg L, Bonnet P, Chajes V. Aspects nutritionnels des acides gras polyinsaturés n-3 Augmentation sélective de la sensibilité des tumeurs à la chimiothérapie par les acides gras polyinsaturés n-3. *OCL*. 2000;7(1):60-63.
51. Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(3):289-299.
52. Serhan CN, Fredman G, Yang R, Karamnov S, Belayev LS, Bazan NG, Zhu M, Winkler JW, Petasis NA. Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway. *Chem Biol*. 2011;18(8):976-987.
53. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*. 2002;196(8):1025-1037.
54. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92-101.
55. J. Lefils-Lacourtablaise. Métabolisme et fonctions des acides gras oméga-3 à longue chaîne au niveau de l'adipocyte. Thèse de doctorat en biochimie, sous la direction de N. Bernoud-Hubac, Lyon, Institut national des sciences appliquées, 2010.
56. ANSES. Rapport d'expertise collective. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. 2011.
57. Song JH, Inoue Y, Miyazawa T. Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols and ethyl esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1997;6:2085-2088.
58. K. Al-Sayed Mahmoud. Extraction, fractionnement et caractérisation des lipides polyinsaturés d'oeufs de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Thèse de doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaire, sous la direction J. Fanni et M. Linder, Nancy, Institut national polytechnique de Lorraine, 2007.
59. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(1):1-32.
60. Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*. 2006;13(1):24-9.
61. Phaner M, Hwang H-S, Winkler-Moser JK, Bakota EL, Liu SX. Protection of fish oil from oxidation with sesamol. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2015;102(2):114-121.
62. Muller-Feuga A. Microalgues marines : les enjeux de la recherche. *Eur J Lipid Sci Technol*. 1997;118(6):885-897.
63. Martin A. Le krill antarctique. *Phytothérapie*. 2007;5(1 Suppl):S6-S13.
64. Domingo JL, Bocio A, Falcó G, Llobet JM. Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*. 2007;230(2-3):219-226.

65. Barnathan G. Sources connues et potentielles de DHA pour les besoins de l'homme. OCL. 2007;14(1):35-43.
66. Cohen Z. Production potential of eicosapentaenoic acid by *Monodus subterraneus*. J Am Oil Chem Soc. 1994;71(9):941-945.
67. Alkhamis Y, Qin JG. Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. J Appl Phycol. 2016;28(1):35-42.
68. Hu H, Ma L-L, Shen X-F, Li J-Y, Wang H-F, Zeng RJ. Effect of cultivation mode on the production of docosahexaenoic acid by *Tisochrysis lutea*. AMB Express. 2018;8(1):50.
69. M. Devos. Application des lipases pour la valorisation de l'acide docosahexaénoïque de la microalgue *Isochrysis galbana*. Thèse de doctorat en Biophysiology des organismes et des populations sous la direction de F. Ergon. Laval, Université du Maine, 2005.
70. Majed N, Li Y, Gu AZ. Advances in techniques for phosphorus analysis in biological sources. Curr Opin Biotechnol. 2012;23(6):852-859.
71. M. Vignani, C. Parisi, E. Rodríguez Cerezo. JRC scientific and policy reports. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe - 2014.
72. Nichols DS, McMeekin TA. Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. J Microbiol Methods. 2002;48(2-3):161-170..
73. Dewapriya P, Kim S. Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. Food Res Int. 2014;56:115-125.
74. Shene C, Leyton A, Rubilar M, Pinelo M, Acevedo F, Morales E. Production of lipids and docosahexaenoic acid (DHA) by a native *Thraustochytrium* strain. Eur J Lipid Sci Technol. 2013;115(8):890-900.
75. Fanni J, Linder M, Parmentier M. Lipides polaires marins. OCL. 2004;11(2):142-145.
76. Devos M, Poisson L, Ergon F, Pencreac'h G. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. Enzyme Microb Technol. 2006;39(4):548-554.
77. Nalder TD, Miller MR, Packer MA. Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis sp.* (T-Iso) grown in batch culture. Aquac Int. 2015;23(5):1293-1312.
78. Guihéneuf F, Mimouni V, Ulmann L, Tremblin G. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol. 2009;369(2):136-143.
79. Gigliotti JC, Davenport MP, Beamer SK, Tou JC, Jaczynski J. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). Food Chem. 2011;125(3):1028-1036.
80. Fang J, Chan O, Kato C, Sato T, Peeples T, Niggemeyer K. Phospholipid FA of piezophilic bacteria from the deep sea. Lipids. 2003;38(8):885-887.
81. Grosdemange A-G. De l'huile de foie de morue aux huiles de poisson concentrées, riches en acides gras polyinsaturés - Vue d'ensemble des techniques de production d'huile de poisson. OCL. 2010;17(4):219-222.
82. Salzer JL, Zalc B. Myelination. Curr Biol. 2016;26(20):R971-5.

83. Bevers EM, Williamson PL. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett.* 2010;584(13):2724-2730.
84. Petrache HI, Salmon A, Brown MF. Structural properties of docosahexaenoyl phospholipid bilayers investigated by solid-state ²H NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2001;123(50):12611-12622.
85. P. Sautot. Propriétés d'auto-assemblage de phospholipides riches en acides gras polyinsaturés : caractérisation physico-chimique et simulation de bicouches par dynamique moléculaire. Thèse de doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaire sous la direction de M. Linder et M. Tarek. Nancy, Université de Nancy, 2011.
86. Goetzl EJ, An S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* 1998;12(15):1589-1598.
87. Gunstone FD, Padley FB. *Lipid Technologies and Applications.* CRC Press; 1997. 856 pp.
88. Nieuwenhuyzen WV. Lecithin production and properties. *J Am Oil Chem Soc.* 1976;53(6):425-427.
89. Bardeau T. Phospholipides bio-sourcés riches en acides gras oméga 3 pour la formulation de liposomes. Thèse de doctorat en Génie des procédés sous la direction de M. Cansell et P. Subra-Paternault, Bordeaux, Université de Bordeaux, 2015.
90. Mehran A, Naser K, Mohsen S. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(1):3-9.
91. Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol Agron Société Environ.* 2004;8(3):163-176.
92. Sagis LMC. *Microencapsulation and microspheres for food applications.* Academic Press; 2015. 435 pp.
93. Ghorbanzade T, Jafari SM, Akhavan S, Hadavi R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chem.* 2017;216:146-152.
94. Betz G, Aeppli A, Menshutina N, Leuenberger H. *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm.* 2005;296(1-2):44-54.
95. Fardet A, Souchon I, Dupont D. *Structure des aliments et effets nutritionnels.* Editions Quae; 2013. 474 pp.
96. Schuchardt JP, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostag Leukotr Ess.* 2013;89(1):1-8.
97. Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, *et al.* Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell.* 1999;4(3):299-308.
98. Ramírez M, Amate L, Gil A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev.* 2001;65(2 Suppl):S95-S101.
99. Davidson MH, Johnson J, Rooney MW, Kyle ML, Kling DF. A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: The ECLIPSE (Epanova® compared to Lovaza® in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study. *J Clin Lipidol.* 2012;6(6):573-584.

100. Liu L, Bartke N, Van Daele H, Lawrence P, Qin X, Park HG, Kothapalli K, Windust A, Bindels J, Wang Z, Brenna JT. Higher efficacy of dietary DHA provided as a phospholipid than as a triglyceride for brain DHA accretion in neonatal piglets. *J Lipid Res.* 2014;55(3):531-539.
101. Rossmesl M, Macek Jilkova Z, Kuda O, Jelenik T, Medrikova D, Stankova B, Kristinsson B, Haraldsson GG, Svensen H, Stoknes I, Sjövall P, Magnusson Y, Balvers MG, Verhoeckx KC, Trzicka E, Bryhn M, Kopecky J. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e38834.
102. Hachem M, Géloën A, Van AL, Foumaux B, Fenart L, Gosselet F, Da Silva P, Breton G, Lagarde M, Picq M, Bernoud-Hubac N. Efficient docosahexaenoic acid uptake by the brain from a structured phospholipid. *Mol Neurobiol.* 2016;53(5):3205-3215.
103. Tsushima T, Ohkubo T, Onoyama K, Linder M, Takahashi K. Lysophosphatidylserine form DHA maybe the most effective as substrate for brain DHA accretion. *Biocatal Agr Biotechnol.* 2014;3(4):303-309.
104. Rai AK, Bhaskar N, Baskaran V. Effect of feeding lipids recovered from fish processing waste by lactic acid fermentation and enzymatic hydrolysis on antioxidant and membrane bound enzymes in rats. *J Food Sci Technol.* 2015;52(6):3701-3710.
105. Lyberg A-M, Fasoli E, Adlercreutz P. Monitoring the oxidation of docosahexaenoic acid in lipids. *Lipids.* 2005;40(9):969-979.
106. Osborn HT, Akoh CC. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Compr Rev Food Sci F.* 2002;1(3):110-120.
107. Hosakawa, Masashi, Ono, Masaya, Takahashi, Koreto. Increase in deformability of human erythrocytes through the action of β -lysophospholipid rich in n-3 polyunsaturated fatty acid content. *J Jpn Oil Chem Soc.* 1992;47(12):1313-1318.
108. Lagarde M, Bernoud-Hubac N. Relevance of DHA-containing lysophospholipids. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012;114(2):112-113.
109. Pieroni G, Coste T. Utilisation du DHA sous forme de phospholipides pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'insuffisance respiratoire. Brevet FR 2 889 957, 2005. EP 1919484B1.
110. Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. Humana Press; 2012. p. 3-30.
111. Nardini M, Dijkstra BW. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol.* 999;9(6):732-737.
112. Schmid RD, Verger R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed.* 1998;37(12):1608-1633.
113. Alloue WAM, Destain J, Ghalfi H, Thonart P, Aguedo M, Wathelet J-P, Blecker C. Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol Agron Société Environ.* 2008;12(1):57-68
114. Akoh C. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. CRC Press; 2017. 1028pp
115. Hou CT. Handbook of Industrial Biocatalysis. CRC Press; 2005. 614 pp.

116. Fickers P, Destain J, Thonart P. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol Agron Société Environ*. 2008;12(2):119-130.
117. Bridelli MG, Capelletti R, Maraia F, Mora C, Pirola L. Initial hydration steps in lipase studied by means of water sorption isotherms, FTIR spectroscopy and thermally stimulated depolarization currents. *J Phys Appl Phys*. 2002;35(10):1039-1048.
118. Cao X, Mangas-Sánchez J, Feng F, Adlercreutz P. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effects of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus oryzae*, support material, and water activity. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2016;118(10):1579-1587.
119. Pérignon M, Lecomte J, Pina M, Renault A, Simonneau-Deve C, Villeneuve P. Activity of immobilized *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B lipases in interesterification reactions: effect of the aqueous microenvironment. *J Am Oil Chem Soc*. 2013;90(8):1151-1156.
120. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev*. 2009;38(2):453-468.
121. Adlercreutz P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6406-36.
122. Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017; 5(16):1-10.
123. Gandhi NN, Patil NS, Sawant SB, Joshi JB, Wangikar PP, Mukesh D. Lipase-catalyzed esterification. *Cataly Rev*. 2000;42(4):439-480.
124. Eichmann TO, Kumari M, Haas JT, Farese RV, Zimmermann R, Lass A, *et al*. Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-o-acyltransferases. *J Biol Chem*. 2012;287(49):41446-41457.
25. Domínguez de María P, Carboni-Oerlemans C, Tuin B, Bargeman G, van der Meer A, van Gemert R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *J Mol Catal B-Enzym*. 2005;37(1-6):36-46.
126. Baeza-Jiménez R, Noriega-Rodríguez JA, García HS, Otero C. Structured phosphatidylcholine with elevated content of conjugated linoleic acid: Optimization by response surface methodology. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2012;114(11):1261-1267.
127. Woo H, Kim J, Kim I-H, Choi H-D, Choi I-W, Kim BH. Substrate selectivity of Novozym 435 in the esterification of glycerol with an equimolar mixture of linoleic, conjugated linoleic, and pinolenic acids. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2016;118(6):928-937.
128. Kurtovic I, Marshall SN, Cleaver HL, Miller MR. The use of immobilised digestive lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) to generate flavour compounds in milk. *Food Chem*. 2016;199:323-329.
129. Valverde LM, Moreno PAG, Callejón MJJ, Cerdán LE, Medina AR. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) by selective alcoholysis catalyzed by lipases. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2013;115(9):990-1004.
130. Lie Ø, Lambertsen G. Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morrhua*): Fatty acid specificity. *Comp Biochem Phys B*. 1985;80(3):447-450.

131. Halldorsson A, Kristinsson B, Haraldsson GG. Lipase selectivity toward fatty acids commonly found in fish oil. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2004;106(2):79-87.
132. Pérez D, Martín S, Fernández-Lorente G, Filice M, Guisán JM, Ventosa A, *et al.* A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS One.* 2011;6(8):e23325.
133. Mnasri T, Ergan F, Herault J, Pencreac'h G. Lipase-catalyzed synthesis of oleoyl-lysophosphatidylcholine by direct esterification in solvent-free medium without water removal. *J Oleo Sci.* 2017;66(9):1009-1016.
134. Yang G, Yang R, Hu J. Lysophosphatidylcholine synthesis by lipase-catalyzed ethanolysis. *J Oleo Sci.* 2015;64(4):443-447.
135. Pereira E.B., Zanin G.M., Castro H.F., Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions, *Braz. J. Chem. Eng.* 2003;20: 343-355
136. Poisson L, Devos M, Godet S, Ergan F, Pencreac'h G. Acyl migration during deacylation of phospholipids rich in docosahexaenoic acid (DHA): an enzymatic approach for evidence and study. *Biotechnol Lett.* 2009;31(5):743-749.
137. Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Krishna SH. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* 2002;20(10):433-437.
138. Guerrand D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL.* 2017;24(4):D403.
139. Chen H, Meng X, Xu X, Liu W, Li S. The molecular basis for lipase stereoselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(8):3487-3495.
140. Choudhury P, Bhunia B. Industrial application of lipase: a review. *Biopharm J.* 2017;1(2):41-47.
141. Guo Z, Vikbjerg AF, Xu X. Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnol Adv.* 2005;23(3):203-259.
142. Casado V, Martín D, Torres C, Reglero G. Phospholipases in food industry: a review. *Methods Mol Biol.* 2012;861:495-523.
143. Mingarro I, Abad C, Braco L. Characterization of acylating and deacylating activities of an extracellular phospholipase A₂ in a water-restricted environment. *Biochemistry.* 1994;33(15):4652-4660.
144. Hong SI, Kim Y, Kim C-T, Kim I-H. Enzymatic synthesis of lysophosphatidylcholine containing CLA from sn-glycero-3-phosphatidylcholine (GPC) under vacuum. *Food Chem.* 2011;129(1):1-6.
145. Egger D, Wehtje E, Adlercreutz P. Characterization and optimization of phospholipase A₂ catalyzed synthesis of phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1343(1):76-84.
146. Lux G, Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R. Phospholipase A₂-catalyzed acylation of lysophospholipids analyzed by experimental design. *Enzyme Microb Technol.* 2014;64:60-66.
147. Tanaka T, Isezaki T, Nakano H, Iwasaki Y. Synthesis of phospholipids containing polyunsaturated fatty acids by phospholipase a₂-mediated esterification with food-compatible reagents. *J Oleo Sci.* 2010;59(7):375-380.

148. Pernas P, Olivier JL, Legoy MD, Bereziat G. Phospholipid synthesis by extracellular phospholipase A₂ in organic solvents. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(2):644-650.
149. Na A, Eriksson C, Eriksson S-G, Österberg E, Holmberg K. Synthesis of phosphatidylcholine with (n-3) fatty acids by phospholipase A₂ in microemulsion. *J Am Oil Chem Soc.* 1990;67(11):766-770.
150. Härröd M, Elfman I. Enzymatic synthesis of phosphatidylcholine with fatty acids, isooctane, carbon dioxide, and propane as solvents. *J Am Oil Chem Soc.* 1995;72(6):641-646.
151. Li D, Qin X, Wang W, Li Z, Yang B, Wang Y. Synthesis of DHA/EPA-rich phosphatidylcholine by immobilized phospholipase A₁: effect of water addition and vacuum condition. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016;39(8):1305-1314.
152. Kim JH, Yoon SH. Effects of organic solvents on transesterification of phospholipids using phospholipase A₂ and lipase. *Food Sci Biotechnol.* 2014;23(4):1207-1211.
153. Adlercreutz D, Wehtje E. An enzymatic method for the synthesis of mixed-acid phosphatidylcholine. *J Am Oil Chem Soc.* 2004;81(6):553-557.
154. Vikbjerg AF, Mu H, Xu X. Synthesis of structured phospholipids by immobilized phospholipase A₂ catalyzed acidolysis. *J Biotechnol.* 2007;128(3):545-554.
155. Borrelli GM, Trono D. Recombinant Lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):20774-20840.
156. More HT, Pandit AB. Enzymatic acyl modification of phosphatidylcholine using immobilized lipase and phospholipase A₂. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010;112(4):428-433.
157. Chen W, Guo W, Gao F, Chen L, Chen S, Li D. Phospholipase A₁-catalysed synthesis of docosahexaenoic acid-enriched phosphatidylcholine in reverse micelles system. *Appl Biochem Biotechnol.* 2017;182(3):1037-1052.
158. Hossen M, Hernandez E. Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2005;107(10):730-736.
159. Zhao T, No DS, Kim BH, Garcia HS, Kim Y, Kim I-H. Immobilized phospholipase A₁-catalyzed modification of phosphatidylcholine with n-3 polyunsaturated fatty acid. *Food Chem.* 2014;157:132-140.
160. Garcia HS, Kim I-H, López-Hernández A, Hill Jr CG, others. Enrichment of lecithin with n-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A₁. *Grasas Aceites.* 2008;59(4):368-374.
161. Cavazos-Garduño A, Ochoa Flores AA, Serrano-Niño JC, Martínez-Sanchez CE, Beristain CI, García HS. Preparation of betulinic acid nanoemulsions stabilized by ω -3 enriched phosphatidylcholine. *Ultrason Sonochem.* 2015;24(1):204-213.
162. Li X., Chen J.F., Yang B., Li D.M., Wang Y.H., Wang W.F. Production of structured phosphatidylcholine with high content of DHA/EPA by immobilized phospholipase A₁-catalyzed transesterification, *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:15244–15258.
163. Ono M, Hosokawa M, Inoue Y, Takahashi K. Water activity-adjusted enzymatic partial hydrolysis of phospholipids to concentrate polyunsaturated fatty acids. *J Am Oil Chem Soc.* 1997;74(11):1415–1417

164. Kim J, Kim B-G. Lipase-catalyzed synthesis of lysophosphatidylcholine. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;864(1):341–344.
165. Adlercreutz D, Budde H, Wehtje E. Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78(4):403–411.
166. Lyberg A-M, Adlercreutz D, Adlercreutz P. Enzymatic and chemical synthesis of phosphatidylcholine regioisomers containing eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2005;107(5):279–290.
167. Kim J, Kim B-G. Lipase-catalyzed synthesis of lysophosphatidylcholine. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;864(1):341–344.
168. Mnasri T. Synthèse enzymatique de lysophosphatidylcholines. Thèse de doctorat en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie sous la direction de F. Ergon. Laval, Université du Maine, 2017.
169. Vikbjerg AF. Enzyme catalyzed production of phospholipids with modified fatty acid profile. Thèse de doctorat. Danemark, BioCentrum-DTU Technical University of Denmark, 2006.
170. Haraldsson GG, Thorarensen A. Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase. *J Am Oil Chem Soc.* 1999;76(10):1143–1149.
171. Estiasih T, Ahmadi K, Ginting E, Albab AU. Optimization of High EPA Structured phospholipids synthesis from omega-3 fatty acid enriched oil and soy lecithin. *J Food Sci Tech.* 2013;3(1):25–32.
172. Virto C, Adlercreutz P. Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme Microb Technol.* 2000;26(8):630–635.
173. Peng L, Xu X, Mu H, Høy C-E, Adler-Nissen J. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enzyme Microb Technol.* 2002;31(4):523–532.
174. Kaki SS, Balakrishna M, Prasad RBN. Enzymatic synthesis and characterization of 1-lipoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine: A novel phospholipid containing lipoic acid: Enzymatic synthesis of lipoic acid based phospholipid. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014;116(10):1347–1353.
175. Kaki SS, Adlercreutz P. Lipase-catalyzed synthesis and characterization of 1-butanoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine, a potential lipidic prodrug of butyric acid. *Chem Phys Lipids.* 2011;164(3):246–250.
176. Chojnacka A, Gladkowski W, Kielbowicz G, Wawrzenczyk C. Isolation of egg-yolk phospholipids and enzymatic modification of their acyl chains. *Lipid Technol.* 2012;24(2):33–35.
177. Reddy JRC, Vijeeta T, Karuna MSL, Rao BVSK, Prasad RBN. Lipase-catalyzed preparation of palmitic and stearic acid-rich phosphatidylcholine. *J Am Oil Chem Soc.* 2005;82(10):727–730.
178. Vikbjerg AF, Peng L, Mu H, Xu X. Continuous production of structured phospholipids in a packed bed reactor with lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *J Am Oil Chem Soc.* 2005;82(4):237–242.

179. Vikbjerg AF, Mu H, Xu X. Parameters affecting incorporation and by-product formation during the production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis in solvent-free system. *J Mol Catal B Enzym.* 2005;36(1–6):14-21.
180. Chojnacka A, Gładkowski W, Gliszczyńska A, Niezgoda N, Kielbowicz G, Wawrzęczyk C. Synthesis of structured phosphatidylcholine containing punicic acid by the lipase-catalyzed transesterification with pomegranate seed oil. *Catal Commun.* 2016;75:60-64.
181. Yang G, Yang L. Increase of oleic acid content in phosphatidylcholine through lipase-catalyzed interesterification: optimization by response surface methodology. *J Oleo Sci.* 2015;64(6):673-682.
182. Hama S, Miura K, Yoshida A, Noda H, Fukuda H, Kondo A. Transesterification of phosphatidylcholine in sn-1 position through direct use of lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells as whole-cell biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(5):1731-1738.
183. Yang T, Fruekilde M-B, Xu X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chem.* 2005;92(1):101-107.
184. Sugasini D, Subbaiah PV. Rate of acyl migration in lysophosphatidylcholine (LPC) is dependent upon the nature of the acyl group. Greater stability of sn-2 docosahexaenoyl LPC compared to the more saturated LPC species. *PLOS ONE.* 2017;12(11):e0187826.
185. Bendif EM, Probert I, Schroeder DC, de Vargas C. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *J Appl Phycol.* 2013;25(6):1763-1776.
186. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem.* 1978;90(1):420-426.
187. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
188. Chen IS, Shen CSJ, Sheppard AJ. Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. *J Am Oil Chem Soc.* 1981;58(5):599-601.
189. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-917.
190. Mrsny RJ, Volwerk JJ, Hayes Griffith O. A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure. *Chem Phys Lipids.* 1986;39(1):185-191.
191. Stewart JC. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem.* 1980;104(1):10-14.
192. Christie WW, Han X. Chapter 5 - Chromatographic analysis of phospholipids and glycosyldiacylglycerols. *Lipid Analysis (Fourth edition).* Woodhead Publishing; 2012. 448pp.
193. Hubert F, Loiseau C, Ergan F, Pencreac'h G, Poisson L. Fast Fatty Acid Analysis by Core-Shell Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Evaporative Light-Scattering Detector. *Food Nutr Sci.* 2017;08(12):1051-1062.

194. Slover HT, Lanza E. Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc.* 1979;56(12):933-943.
195. Ifeduba EA, Akoh CC. Modification of stearidonic acid soybean oil by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase to incorporate caprylic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 2014;91(6):953-965.
196. Webster GK, Jensen JS, Diaz AR. An investigation into detector limitations using evaporative light-scattering detectors for pharmaceutical applications. *J Chromatogr Sci.* 2004;42(9):484-490.
197. Bravi E, Perretti G, Montanari L. Fatty acids by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detector. *J Chromatogr A.* 2006;1134(1-2):210-214.
198. Zhao J, Li SP, Yang FQ, Li P, Wang YT. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. *J Chromatogr A.* 2006;1108(2):188-194.
199. Deschamps FS, Baillet A, Chaminade P. Mechanism of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid. *The Analyst.* 2002;127(1):35-41.
200. Han X, Gross RW. Structural determination of lysophospholipid regioisomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* 1996;118(2):451-457.
201. Chen IS, Shen CSJ, Sheppard AJ. Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. *J Am Oil Chem Soc.* 1981;58(5):599-601.
202. Balasubramanian RK, Yen Doan TT, Obbard JP. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chem Eng J.* 2013;215-216(Suppl):S929-S936.
203. Iqbal J, Theegala C. Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. *Algal Res.* 2013;2(1):34-42
204. Chua SC, Tan CP, Mirhosseini H, Lai OM, Long K, Baharin BS. Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. *J Food Eng.* 2009;92(4):403-409.
205. Mulders KJM, Weesepeel Y, Lamers PP, Vincken J-P, Martens DE, Wijffels RH. Growth and pigment accumulation in nutrient-depleted *Isochrysis aff. galbana* T-ISO. *J Appl Phycol.* 2013;25(5):1421-1430.
206. Soudant P, Le Coz J-R, Marty Y, Moal J, Robert R, Samain J-F. Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1998;119(2):451-457.
207. Balduyck L, Bijttebier S, Bruneel C, Jacobs G, Voorspoels S, Van Durme J, Muylaert K, Foubert I. Lipolysis in *T-Isochrysis lutea* during wet storage at different temperatures. *Algal Res.* 2016;18:281-287.
208. Plouguerné E, de Souza LM, Sasaki GL, Cavalcanti JF, Villela Romanos MT, da Gama BA, Pereira RC, Barreto-Bergter E. Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (sqdgs) from the brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Mar Drugs.* 2013;11(11):4628-4640.

209. Nunes PA, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chem.* 2011;127(3):993-998.
210. Oh J-E, Lee K-W, Park H-K, Kim J-Y, Kwon K-I, Kim J-W, *et al.* Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil with capric acid: effect of water activity on incorporation and acyl migration. *J Agric Food Chem.* 2009;57(19):9280-9283.
211. Hong SH, Khoutorova L, Bazan NG, Belayev L, Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood–brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats, *Exp. Transl. Stroke Med.* 2015;7(1):3-13.
212. Bernoud N, Fenart L, Moliere P, Dehouck M-P, Lagarde M, Cecchelli R, Lecerf JI. Preferential transfer of 2-docosahexaenoyl-1-lysophosphatidylcholine through an in vitro blood-brain barrier over unesterified docosahexaenoic acid. *J Neurochem.* 1999;72(1):338–345.

Annexe I

Topical issue on:

LIPIDES DU FUTUR
LIPIDS OF THE FUTURE

PROCEEDINGS

OPEN ACCESS

Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*

Florence Hubert, Laurent Poisson*, Céline Loiseau, Laurent Gauvry, Gaëlle Pencreac'h, Josiane Héroult and Françoise Ergon

Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160), Université du Maine, IUT de Laval, 52 rue des Drs Calmette et Guérin, BP 2045, 53020 Laval cedex, France

Received 27 January 2017 – Accepted 21 April 2017

Abstract – Marine microalgae are now well-known for their ability to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Among these microalgae, *Isochrysis galbana* has received increasing interest especially because of its high DHA content and its common use in hatchery to feed fish larvae and clams. Moreover, lipolysis occurring from the biomass harvest stage suggests that *I. galbana* may contain lipolytic enzymes with potential interesting selectivities. For these reasons, the potential of this microalga for the production of valuable lipids and lipolytic enzymes was investigated. Lipid analysis revealed that DHA is mainly located at the sn-2 position of the phospholipids. Thus, *I. galbana* was considered as an interesting starting material for the lipase catalyzed production of 1-lyso-2-DHA-phospholipids which are considered as convenient vehicles for the conveyance of DHA to the brain. Lipids from *I. galbana* can also be used for the enzyme-catalyzed production of structured phospholipids containing one DHA and one medium chain fatty acid in order to combine interesting therapeutic and biological benefits. Starting from total RNA extract from *I. galbana*, coding sequences of putative lipolytic enzymes were obtained by RACE and Nested PCR. The heterologous expression of a sequence designated IgTeCe was implemented. An expression plasmid was constructed by ligating the coding sequence to a plasmid vector and then cloned and expressed in *E. coli*. Results showed the effective functionality of plasmid construction for the production of a recombinant protein with the expected molecular mass. Moreover, local alignment using BLASTP and biochemical evidences support the hypothesis that the expressed protein is a thioesterase.

Keywords: microalgae / ω -3 polyunsaturated fatty acids / phospholipids / lipolytic enzymes

Résumé – Lipides et enzymes lipolytiques de la microalgue *Isochrysis galbana*. Les microalgues marines sont maintenant bien connues pour leur aptitude à produire des acides gras à longue chaîne de la série ω -3 comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) ou eicosapentaénoïque (EPA). Parmi ces microalgues, *Isochrysis galbana* connaît, ces dernières années, un intérêt croissant du fait d'un contenu lipidique riche en DHA et de son importante utilisation en éclosion pour nourrir les larves de poissons et les bivalves. D'autre part, la lipolyse souvent observée dès l'étape de collecte de la biomasse ainsi que la forte teneur en DHA suggère qu'*I. galbana* pourrait contenir des enzymes lipolytiques intéressantes en termes de sélectivité. Pour ces différentes raisons, le potentiel de cette microalgue pour la production de lipides d'intérêt et d'enzymes lipolytiques a été étudié. L'analyse des lipides d'*I. galbana* a tout d'abord révélé que le DHA était majoritairement greffé sur la position sn-2 des phospholipides. Dans ce contexte, les phospholipides d'*I. galbana* constituent une matière première intéressante pour la production, par voie enzymatique, de 1-lyso-2-DHA phospholipides, des composés intéressants pour optimiser le transport du DHA au niveau du cerveau. À partir des lipides d'*I. galbana*, on peut également envisager la production, toujours par voie enzymatique, de phospholipides structurés contenant du DHA et un acide gras à chaîne moyenne ce qui permet de combiner des intérêts thérapeutiques et biologiques intéressants. À partir des ARN totaux d'*I. galbana*, des séquences codant des enzymes lipolytiques putatives ont été obtenues par RACE et Nested PCR. L'expression hétérologue d'une séquence nommée IgTeCe a été initiée. Une construction plasmidique contenant la séquence codante a été clonée et exprimée avec *E. coli*. Les résultats ont montré que la

* Correspondence: laurent.poisson@univ-lemans.fr

construction plasmidique permettait bien d'obtenir une protéine recombinante avec la masse moléculaire attendue. D'autre part, l'outil d'alignement local de séquences, BLASTP, ainsi que des données biochimiques ont permis de confirmer l'hypothèse que la protéine obtenue était une thioestérase.

Mots clés : microalgues / acide gras polyinsaturés ω -3 / phospholipides / enzymes lipolytiques

1 Introduction

Microalgae are unicellular photosynthetic and eukaryotic organisms with a wide range of morphologies, shapes, sizes and aspects. Actually, the total number of algae species has been recently estimated to 72,500 despite some uncertainties regarding what organisms should be included as algae or microalgae (Guiry, 2012). Primary producers of the aquatic ecosystems, microalgae belong, along with the cyanobacteria, to the so-called “phytoplankton” consumed by zooplankton, fish larvae and clams. According to favorable conditions, microalgae have periods of fast growth called “bloom” that can cause red tides. Besides, these tides can sometimes be associated with the production of phycotoxins and lead to harmful algal blooms (HAB) and shellfish poisoning (Masó and Garcés, 2006).

Boosted by the attracting market of biofuels, microalgae have received increasing interest during the last decade and today they are considered as sustainable natural factories for the production of a wide range of molecules with potential applications in the field of feed, food, cosmetics, pharmaceuticals and energy (Mimouni *et al.*, 2012; Person, 2010).

As photosynthetic organisms, microalgae are a source of pigments such as β -carotene, that can be found for instance in the halophilic strain *Dunaliella salina* cultivated on a large scale along the California coast. Other species like *Porphyridium cruentum* are also known to be sources of interesting polysaccharides. Nevertheless, the most promising biochemical compounds that can be found in microalgae are certainly the lipids for their ω -3 fatty acids (Mimouni *et al.*, 2015; Poisson *et al.*, 2002) and mainly for the production of biodiesel which has been an important topic for several years now (Cadoret and Bernard, 2008).

However, according to many literature data, to be interesting from an economical point of view, biodiesel needs to be coproduced with other high added value molecules leading to the concepts of “bio-refinery” and “cellular milking” (Vinayak *et al.*, 2015).

In this frame, the present paper is aimed at presenting the interest of the microalga *Isochrysis galbana* for the production of lipids and lipolytic enzymes with potential applications.

2 *Isochrysis galbana*: an overview

Isochrysis galbana is one of the species of the Isochrysidales order, belonging to the haptophyta division (phylum) (Fig. 1). Unlike other microalgae classified within the Isochrysidales such as *Emiliana huxleyi*, *I. galbana* has no dimorphic lifecycle and does not form calcareous coccoliths. Moreover, contrary to *Emiliana huxleyi*, *I. galbana* exhibits organic scales (Bendif *et al.*, 2013).

First identified by Bruce, Knight and Parke in 1939, *Isochrysis galbana* is a rather small round to ovoid cell (2–5 μ m; 40–50 μ m³) bearing two smooth apical flagella (Fig. 1). In reference to the division name, the cells were also bearing

(A)

Empire : Eukaryota
Kingdom : Chromista
Phylum : Haptophyta
Class : Coccolithophyceae
Subclass : Prymnesiophyceae
Order : Isochrysidales
Family : Isochrysidaceae

(B)



Fig. 1. (A) Elements of classification; (B) photograph of *Isochrysis galbana* (photonic microscopy \times 400).

a reduced haptonema said “vestigial” inserted between the two flagella (Robert *et al.*, 2004).

Up to date, two strains of *Isochrysis* were mainly described and studied in literature: T-Iso and Parke.

Isochrysis affinis galbana, more simply designated as T-iso, was formerly said to be a Tahitian clone conspecific with *I. galbana* Parke which originate from temperate zones. In link with its origin, T-Iso is capable of adapting to a much broader range of temperature and light conditions when comparing with *I. galbana* Parke (Ewart and Pruder, 1981; Tzovenis *et al.*, 2003).

Apart from its plastid coloration which is more yellow, T-Iso is similar to Parke from a morphological point of view and no difference can be noticed nor by photonic microscopy nor by scanning electronic microscopy (SEM) (Robert *et al.*, 2004).

In 2013, using, as molecular phylogenetic markers, the genes coding RNA small ribosomal subunit (SSU rRNA), Bendif *et al.* (2013) concluded that the genetic distance between T-Iso and *I. galbana* is sufficient to raise T-Iso as a new genus. This new genus was called *Tisochrysis lutea* in reference to the former name of the strain and to the yellow color of the cells.

In the same area, *Pseudoisochrysis paradoxa* was also renamed *Isochrysis galbana*.

Before this recent revision, the strains of *Isochrysis* were not always fully characterized and some confusion may have occurred in literature as already pointed, more generally for whole microalgae, by Muller-Feuga (1997).

I. galbana and *T. lutea* can be obtained worldwide in several culture collections under different specific strain codes (Tab. 1). This can also be a source of error in literature.

To be suitable in mollusc hatchery, algal cells have to present four main features:

- a size below 30 μ m or even 10 μ m for the early larval stages;
- devoided of cell wall or organs making their ingestion difficult;
- an adequate nutritional value;
- easy to cultivate on a large scale (Robert and Trintignac, 1997).

Combining these four features, *I. galbana* and more particularly *Tisochrysis lutea* were intensively used for years in hatchery to feed fish larvae and clams.

Table 1. List of principal strain codes of *Isochrysis galbana* and relatives.

Name	Strain code					Isolator	Remark
	CCAP	PLY	NCMA	UTEX	RCC		
<i>Isochrysis</i> sp.	CCAP 927/12	PLY240			RCC3709	Butcher	/
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	CCAP 927/1	PLY565	CCMP1323	LB 987	RCC1348	Parke	/
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	CCAP 949/1	PLY507	CCMP715	LB 1988	RCC1353	Ott	Formerly <i>Pseudoisochrysis paradoxa</i>
<i>Tisochrysis lutea</i>	CCAP 927/14	PLY506	CCMP1324	LB 2307	RCC 1349	Haines	/

CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa (UK); PLY: Plymouth (UK); NCMA: National Center for Marine Algae and Microbiota (formerly CCMP) (USA); UTEX: University of Texas (USA); RCC: Roscoff Culture Collection (France).

In the frame of the study concerning lipolytic enzymes, *I. galbana* Parke (CCAP 927/1) was cultivated on Provasoli 1/3 medium in 500 mL Erlenmeyer flasks as previously described (Poisson and Ergan, 2001).

For the studies concerning lipids, larger amounts of biomass from *I. galbana* Parke (CCAP 927/1) and *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) were obtained from Greensea (Mèze, France). The microalgae were cultivated in 100 L photobioreactors on sea water adjusted at 28 g.L^{-1} with respect to salinity. Photobioreactors were incubated at 20°C under continuous illumination of $100 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Agitation was provided by air bubbling and CO_2 injection. Microalgae were harvested by centrifugation in the early stationary phase when the lipid content is at the highest. Then, the vessel containing the harvested biomass was bathed in boiling water. The purpose of this step is to inhibit endogenous enzymatic activity; this is crucial since it allows to prevent the extent of lipolysis occurring in biomass during wet storage very shortly after harvest (Balduyck *et al.*, 2016).

3 Lipids

Total lipids were extracted from the biomass using an optimized method derived from Folch *et al.* (1957) complemented by ultrasonic treatment (unpublished results).

Total lipids were classically separated by G60 silica gel chromatography using successively dichloromethane, acetone and methanol as eluting solvents. Total lipids and fatty acid analyses were carried out respectively by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC) as previously described (Devos *et al.*, 2006).

TLC of total lipids carried out by a double development in one dimension (Fig. 2) revealed the presence of three types of lipids:

- neutral lipids with sterol, triacylglycerol and a ghost spot of free fatty acids;
- glycolipids with in particular sulfoquinovosyldiacylglycerides (SQDG) an interesting compound which is reported to have anti-tumoral and antiviral activities (Hossain *et al.*, 2005; Plouguerné *et al.*, 2013);
- phospholipids mostly containing phosphatidylcholine.

Table 2 shows fatty acid profiles obtained by GC. In total lipids, eight main fatty acids can be found from myristic acid (C14:0) to docosahexaenoic acid (C22:6-DHA) which represents 13.5% of the total fatty acids in *I. galbana* Parke (CCAP 927/1). DHA is a ω -3 polyunsaturated fatty acid

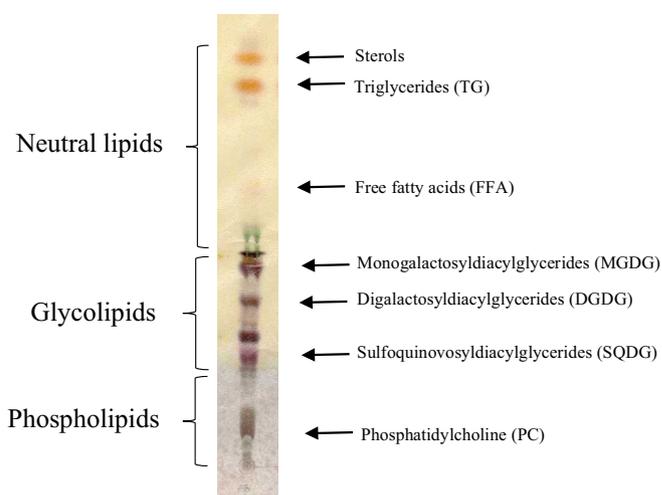


Fig. 2. Thin layer chromatography of *Isochrysis galbana* Parke (927/1) total lipids. Eluant 1 (half plate starting from the bottom): methyl acetate / propan-2-ol/ chloroform / methanol / 0.25% aqueous KCl (25/25/25/10/9); eluant 2 (entire plate): hexane/diethyl ether/glacial acetic acid (80/20/2); visualization: α -naphthol solution; components were identified by comparison with standards analysed under the same conditions.

(PUFA) known for its health benefits on cardiovascular system and cognitive functions. However, its consumption is less than the recommended daily intake in most occidental countries (Barnathan, 2007; Bourre, 2005).

When comparing the fatty acid composition of the different lipid fractions, it can be assumed that the phospholipid composition is quite different from the two others with 25% of myristic acid and especially 50% of DHA which is pretty high. Similar results were obtained with *T. lutea* except for the content of linoleic acid which appeared to be higher when comparing with *I. galbana* Parke. Concerning *T. lutea* lipids, it can also be noticed that a mutant has been recently obtained by IFREMER Nantes leading to an increase of 80% for neutral lipids productivity (Bougaran *et al.*, 2012).

To go further with *I. galbana* lipids, the location of DHA on the phospholipid backbone was determined. The phospholipids from *I. galbana* were submitted to hydrolysis catalyzed by a phospholipase A2 (PLA2). The time course of this reaction clearly showed that DHA was preferentially released so it can be concluded that DHA is mainly located at the sn-2 position (Devos *et al.*, 2006).

Table 2. Main fatty acids in lipids from *Isochrysis galbana* Parke (927/1) and *Tisochrysis lutea*.

Fatty acid	Common name	wt% total fatty acids							
		<i>I. galbana</i> Parke				<i>T. lutea</i>			
		TL	NL	GL	PL	TL	NL	GL	PL
C14:0	Myristic acid	18.0	11.8	21.4	25.3	14.6	9.6	13.3	20.4
C16:0	Palmitic acid	8.8	13.8	10.5	10.1	12.3	16.0	14.6	5.3
C16:1	Palmitoleic acid	2	/	/	/	/	7.4	9.2	/
C18:1	Oleic acid	13.5	15.8	13.0	9.7	8.7	8.5	11.5	12.5
C18:2	Linoleic acid	4.3	5.3	4.6	1.5	18.9	9.7	24.0	2.9
C18:3	Linolenic acid	11.4	11.0	15.4	0.8	8.9	4.8	12.9	0.8
C18:4	Stearidonic acid	9.5	12.7	10.9	0.5	9.5	6.3	8.6	0
C22 :6	Docosahexaenoic acid	13.5	7.3	3.1	49.8	5.4	6.9	2.3	43.5

TL:total lipids; NL: neutral lipids; GL: glycolipids; PL: phospholipids; /: not detected or not taken into account.

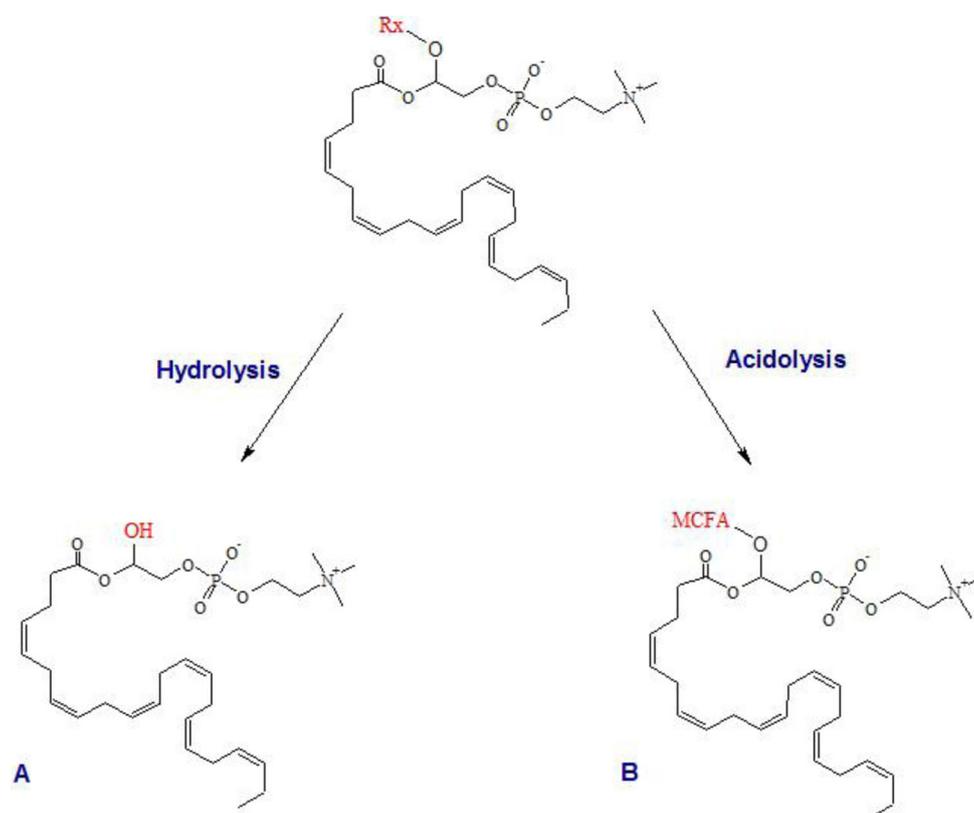


Fig. 3. Enzyme-catalyzed modification of phosphatidylcholine from *Isochrysis galbana* to obtain DHA-lysophosphatidylcholine (A) and structured phosphatidylcholine containing DHA (B). Rx: nonspecific fatty acid; MCFA: specific medium-chain fatty acid.

Starting with this raw material, a selective deacylation can be implemented to produce lysophospholipids rich in DHA (Fig. 3A). In the last decade, several studies have contributed to suggest that lyso-PLs are convenient vehicles for an optimal absorption of DHA in the brain. Moreover, DHA is reported to be less suggested to oxidation when associated with phospholipids comparing with triglycerides (Pencréac'h *et al.*, 2013).

Phospholipids from *I. galbana* appear also to be convenient for the production of structured phospholipids containing DHA and a medium chain fatty acid like caprylic acid (C8:0) with a view to combine rapid energy intake with health benefits (Fig. 3B). Moreover, it has been reported in literature that medium-chain fatty acids (MCFAs) may improve bioavailability of PUFAs (Lemarié *et al.*, 2016). The production of

DHA lysophospholipids as well-structured phospholipids can be achieved by enzymatic catalysis using more particularly lipases (Devos *et al.*, 2006; Vikbjerg, 2006).

4 Lipolytic enzymes

As mentioned above, when biomass was not treated with boiling water, important amounts of free fatty acids are detected in the total lipid extracts: this may suggest the presence of endogenous lipolytic enzymes. Moreover, the high proportion of PUFAs in *I. galbana* could also suggest attractive enzyme specificities. Very few data can be found in literature concerning this point. For these reasons, the exploration of lipolytic enzymes from *I. galbana* Parke (CCAP 927/1) was implemented.

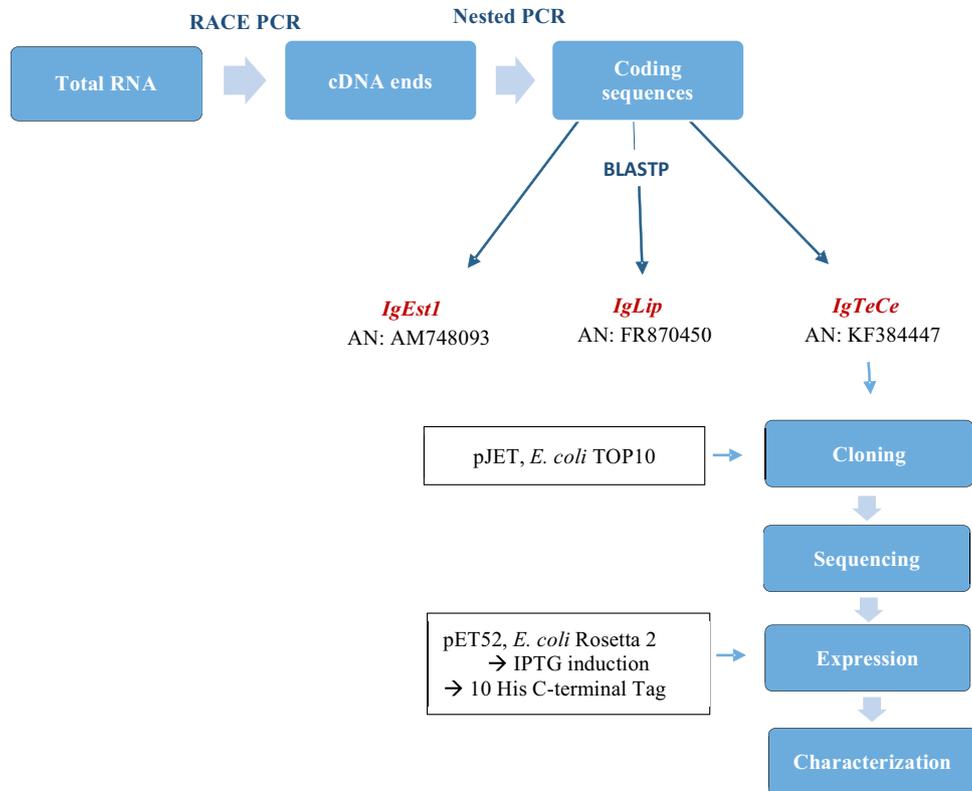


Fig. 4. General strategy for *Isochrysis galbana* lipolytic enzyme exploration and heterologous protein production.

Starting from the total mRNA extract, complete cDNA of putative lipolytic enzymes were obtained after RACE and Nested PCR (Fig. 4). Specific primers used for RACE and Nested PCR were designed by consulting *I. galbana* Express Sequence Tag Database. This protocol allowed to obtain three coding sequences. *In silico* analysis using BLASTP alignment led to assign the first sequence as being a putative esterase designated “Igest1” and registered under the accession number FR870450. The second sequence showed close relationships with fungal lipases and has been designated “Iglip” and recorded under the accession number FR870450. The third sequence was designated as “IgTeCe” standing for *I. galbana* thioesterase-carboxylesterase (Godet *et al.*, 2010; 2012; Kerviel *et al.*, 2014).

To go further, the heterologous expression of IgTeCe was then implemented. IgTeCe was ligated in pJET plasmid and cloned into *E. coli* strain TOP 10 (Fig. 4). Cloning products were verified by sequencing and the expression of IgTeCe was performed into *E. coli* strain Rosetta2 using the plasmid pET 52. It has to be noticed that pET 52 contains an induction system working with IPTG and allows for the production of a protein containing a deca-histidine C-terminal tag (Kerviel *et al.*, 2014).

After expression, soluble proteins were submitted to SDS-PAGE analysis (Fig. 5). No significant additional band can be clearly noticed on lane corresponding to the induced cells when comparing with the non-induced cells. Nevertheless, when the proteins were blotted and detected with Anti-His antibodies, the membrane revealed two bands only with the induced cells (Fig. 5). The major one agrees with the predicted size of the recombinant protein, that is to say 46.18 kDa. To explain the second band, the hypothesis of a phosphorylated form of the protein can be made. Reverse Transcriptase PCR

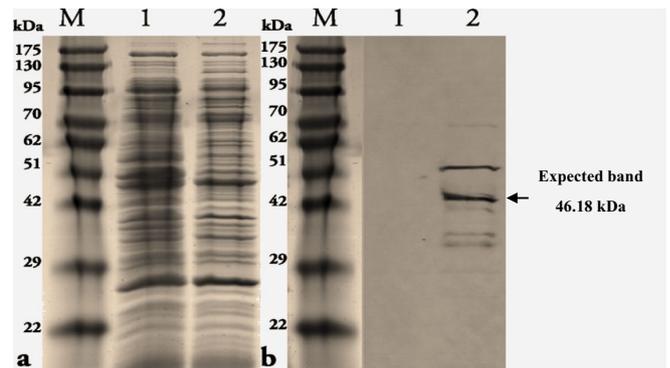


Fig. 5. SDS-PAGE (a) and western blot (b) analyses of soluble fraction of IgTeCe from *E. coli*. Lane M: Molecular mass (GeneDirex), lane 1: negative control, lane 2: induced cells with 1mM IPTG (from Kerviel *et al.*, 2014).

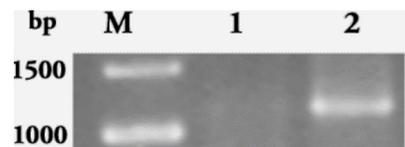


Fig. 6. RT-PCR analysis of the expression of IgTeCe gene after induction with 1 mM IPTG. Lane M: molecular mass, lane 1: negative control, lane 2: cells induced with 1 mM IPTG (from Kerviel *et al.*, 2014).

implemented with primers specific of the IgTeCe gene, confirm that a transcript was only present when IPTG was added but not in the absence of IPTG (Fig. 6).

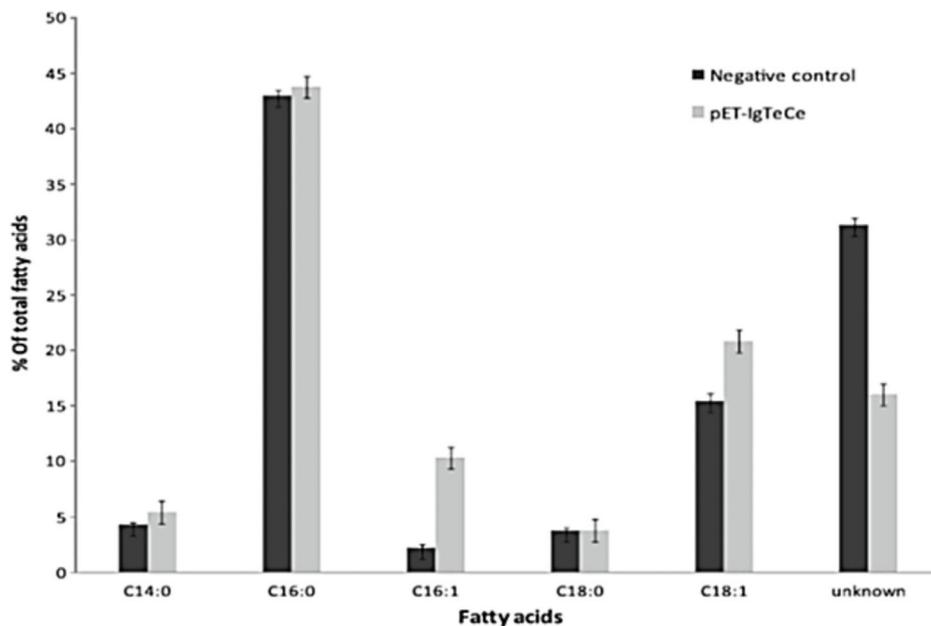


Fig. 7. Fatty acid composition of *Escherichia coli* strain expressing pET IgTeCe. Data are means of triplicates (from Kerviel *et al.*, 2014).

By local alignment using BLASTP, the obtained protein displays similarities with thioesterases. To confirm this finding, the fatty acid profile of *E. coli* IPTG induced cells has been compared with *E. coli* non-induced cells. A fatty acid analysis of both cell types was carried out by GC (Fig. 7). A high proportion of palmitic acid and the presence of six other fatty acids can be noticed. Two other fatty acids remain unknown when comparing with all fatty acid standards available in the lab. Presumably, they could be branched-chain fatty acids commonly found in the lipids of bacteria. It appeared that IgTeCe expression led to an increase in palmitoleic acid (C16:1) from around 2% to 10% and an increase in oleic acid (C18:1) from 15% to 21%. On the other hand, the proportion of the two unknown fatty acids decreased. In literature, similar modification was observed with heterologous expression of acyl ACP thioesterase. Indeed, Chen *et al.* (2012) published very similar results with a thioesterase from peanut. Thus, the hypothesis that the expressed protein is a thioesterase appears to be consistent. Actually, thioesterase are quite interesting enzymes since they can be used to improve the release of free fatty acid and to alter the fatty acid profile with a view to obtain a particular lipid composition needed for a specific application such as biofuel production (Chen *et al.*, 2012; Kerviel *et al.*, 2014).

5 Conclusion

Apart from their potential in aquaculture *I. galbana* Parke and *T. lutea* also constitute an original source of phospholipids and enzymes with interesting applications in human nutrition and biotechnology. Nevertheless, to take the most of these molecules, they need to be integrated in a more complete valorization of high value compounds leading to a kind of “microalgae cracking”. To make it feasible, an integrated approach needs to be implemented to explore *I. galbana* Parke and *T. lutea* from biomass production to product extraction

and valorization. This may go through collaborative works specifically dedicated to these microalgae and through the building of comprehensive genomic and transcriptomic data catalogues.

Acknowledgements. This work was financially supported by “Laval agglomération” and the “conseil départemental de la Mayenne”.

References

- Balduyck L, Bijttebier S, Bruneel C, *et al.* 2016. Lipolysis in *T-Isochrysis lutea* during wet storage at different temperatures. *Algal Res* 18: 281–287.
- Barnathan G. 2007. Sources connues et potentielles de DHA pour les besoins de l’homme. *OCL* 14: 35–43.
- Bendif EM, Probert I, Schroeder DC, de Vargas C. 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *J Appl Phycol* 25: 1763–1776.
- Bougaran G, Rouxel C, Dubois N, *et al.* 2012. Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnol Bioeng* 109: 2737–2745.
- Bourre JM. 2005. Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging* 9: 31–38.
- Cadoret J-P, Bernard O. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *J Soc Biol* 202: 201–211.
- Chen G, Peng Z, Shan L, *et al.* 2012. Cloning of Acyl-ACP thioesterase FatA from *Arachis hypogaea* L. and its expression in *Escherichia coli*. *J Biomed Biotechnol* 2012: 65257
- Devos M, Poisson L, Ergon F, Pencreac’h G. 2006. Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosa-hexaenoic acid enrichment. *Enzyme Microb Technol* 39: 548–554.

- Ewart JW, Pruder GD. 1981. Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis* aff. *Galbana*, clone T-iso at four temperatures and three light intensities. *J World Maric Soc* 12: 333–339.
- Godet S, Loiseau C, Pencreac'h G, Ergan F, Hérault J. 2010. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding a novel putative esterase from the marine microalga *Isochrysis galbana* (prymnesiophyceae, haptophyta). *J Phycol* 46: 679–684.
- Godet S, Hérault J, Pencreac'h G, Ergan F, Loiseau C. 2012. Isolation and analysis of a gene from the marine microalga *Isochrysis galbana* that encodes a lipase-like protein. *J Appl Phycol* 24: 1547–1553.
- Guiry MD. 2012. How many species of algae are there? *J Phycol* 48: 1057–1063.
- Hossain Z, Kurihara H, Hosokawa M, Takahashi K. 2005. Growth inhibition and induction of differentiation and apoptosis mediated by sodium butyrate in caco-2 cells with algal glycolipids. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 41: 154–159.
- Kerviel V, Hérault J, Dumur J, Ergan F, Poisson L, Loiseau C. 2014. Cloning and expression of a gene from *Isochrysis galbana* modifying fatty acid profiles in *Escherichia coli*. *J Appl Phycol* 26: 2109–2115.
- Lemarié F, Beauchamp E, Legrand P, Rioux V. 2016. Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie* 120: 40–48.
- Masó M, Garcés E. 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Mar Pollut Bull* 53: 620–630.
- Mimouni V, Ulmann L, Pasquet V, *et al.* 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Curr Pharm Biotechnol* 13: 2733–2750.
- Mimouni V, Ulmann L, Haimeur A, Guéno F, Meskini N, Tremblin G. 2015. Marine microalgae used as food supplements and their implication in preventing cardiovascular diseases. *OCL* 22: D409.
- Muller-Feuga A. 1997. Microalgues marines : les enjeux de la recherche. Document IFREMER. Available from <http://archimer.ifremer.fr/>.
- Pencreac'h G, Ergan F, Poisson L. 2013. DHA-lysophospholipid Production. *Curr Org Chem* 17: 793–801.
- Person, J. 2010. Algues, filières du futur. Livre turquoise. AdebioTech.
- Plouguerné E, de Souza LM, Sasaki GL, *et al.* 2013. Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Mar Drugs* 11: 4628–4640.
- Poisson L, Ergan F. 2001. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. *J Biotechnol* 91: 75–81.
- Poisson L, Devos M, Pencreac'h G, Ergan F. 2002. Acides gras polyinsaturés de microalgues : intérêts et développements actuels. *OCL* 9: 92–95.
- Robert R, Trintignac P. 1997. Microalgues et nutrition larvaire en éclosion de mollusques. *Haliotis* 26: 1–13.
- Robert R, Chretiennot-Dinet M-J, Kaas R, *et al.* 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage. Document IFREMER. Available from <http://archimer.ifremer.fr/>.
- Tzovenis I, De Pauw N, Sorgeloos P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture* 216: 203–222.
- Vikbjerg AF. 2006. Enzyme catalyzed production of phospholipids with modified fatty acid profile. PhD thesis. BioCentrum – Technical University of Denmark.
- Vinayak V, Manoylov KM, Gateau H, *et al.* 2015. Diatom milking: a review and new approaches. *Mar Drugs* 13: 2629–2665.

Cite this article as: Hubert F, Poisson L, Loiseau C, Gauvry L, Pencreac'h G, Hérault J, Ergan F. 2017. Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL* 24(4): D407.

Annexe II

Fast Fatty Acid Analysis by Core-Shell Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Evaporative Light-Scattering Detector

Florence Hubert, Céline Loiseau, Françoise Ergan, Gaëlle Pencreac'h, Laurent Poisson*

Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160) Le Mans Université, IUT de Laval, Laval, France

Email: *Laurent.poisson@univ-lemans.fr

How to cite this paper: Hubert, F., Loiseau, C., Ergan, F., Pencreac'h, G. and Poisson, L. (2017) Fast Fatty Acid Analysis by Core-Shell Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Evaporative Light-Scattering Detector. *Food and Nutrition Sciences*, 8, 1051-1062.

<https://doi.org/10.4236/fns.2017.812077>

Received: September 11, 2017

Accepted: November 30, 2017

Published: December 4, 2017

Copyright © 2017 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

A high-performance liquid chromatography analysis method with an evaporative light-scattering detector has been developed for the separation and quantitative analysis of free fatty acids in biological matrices. Core-shell reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of 10 free fatty acids is achieved within 10.5 min using a methanol/water (0.05% trifluoroacetic acid) eluent gradient. After optimization, the drift tube and nebulization temperature of the evaporative light-scattering detector was set at 35°C, nitrogen flow-rate at 1.1 standard liter per minute and column temperature at 25°C. All calibration curves showed good regression ($r^2 > 0.9975$). A validation procedure following the International Conference on Harmonisation guidelines was implemented to certify the method. Relative standard deviations did not exceed 1.5% and 4.25% for repeatability and reproducibility respectively.

Keywords

Free Fatty Acids, HPLC, Evaporative Light-Scattering Detector, Core-Shell Technology, Method Validation

1. Introduction

The development of fast high-performance liquid chromatography (HPLC) methods for routine analysis is of interest for a rapid identification and quantification of free fatty acids (FFAs).

Gas chromatography (GC) is obviously the most commonly used method for FFA analysis. However, before analysis, FFAs must be methylated to obtain fatty

acid methyl esters which is tedious and time consuming. Moreover, there is a risk of structural degradation during this methylation process since it requires high temperature under alkaline conditions. For this reason, accuracy of GC analysis can be greatly affected when unstable molecules like long chain polyunsaturated FFAs need to be quantified [1]. Compared to GC, HPLC analysis can be conducted at low temperature thus limiting the risk of heat degradation of the samples. Moreover, FFAs can be directly assayed without any laborious preparation step [2]. HPLC is also convenient because it is simple to implement and generally provides good reproducibility. The main drawback of using HPLC for FFA analysis when using standard UV detector is that only FFAs with double bonds can be detected. Moreover, the use of a non-absorbing solvent is required, thus limiting the choice of the mobile phase. To overcome this drawback, different alternative detection systems can be implemented such as an evaporative light-scattering detector (ELSD). ELSD is a universal detector only sensitive to the mass of the vaporized analyte and is not limited by light absorption characteristics of the individual components and/or eluent nature [3]. In ELSD, the solvent is evaporated and the only requirement is a low volatility of the compounds as compared to the mobile phase. It also allows stable baselines even when multi-solvent gradients are used. Nevertheless, for an optimal operation, several ELSD parameters need to be tuned even though ELSD optimization is seldom reported in literature.

In recent years, HPLC columns have also been considerably improved. For example, core-shell silica particles have been increasingly used for highly efficient separation with fast flow rate and relatively low back pressure [4].

To the best of our knowledge, HPLC methods specifically dedicated to fatty acids in their free form are rarely described. An overview of the recent published papers is presented in **Table 1**. A wide range of equipment including HPLC columns and detectors are used. Even though some of these methods show clear advantages, they are either quite expensive or not fast enough, or present a low resolution.

The purpose of this study is to propose an HPLC method which is at a time, fast, simple and accurate for determination and quantification of numerous FFAs that can be found in different lipids and food matrices. Thus, the developed HPLC method takes into account the advantages of both core-shell technology and ELSD. Firstly, this study focuses on optimization of ELSD operating parameters, namely drift tube and nebulization temperatures and nitrogen flow rate. Column temperature was also optimized in order to reach maximal peak resolution. Then, the method was validated following the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines [10].

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals, Reagents and Standards

Ultrapure water was produced using a Millipore Q water purification system

Table 1. Principal advantages and drawbacks of HPLC methods dedicated to free fatty acid analysis.

ref	Column	Detector	Advantages/drawbacks
[5]	Hypersil Gold aQ (150 × 4.6 mm; 5 µm) Hypersil Gold aQ (150 × 4.6 mm; 3 µm)	UV detector 210 nm	Reasonable run time (15 min) Standard UV detector Short Ultraviolet wavelength near or below cut-off of many solvents Only short chain fatty acids can be analyzed
[6]	Chromolith Performance-Si (100 × 4.6 mm)	ELSD detector	Monolithic column allows high flow rates due to low back pressure Complex mixtures of lipid classes can be separated. Not convenient for the separation of free fatty acid species
[7]	Hypersil BDS C8 (200 × 4.6 mm; 5 µm)	Fluorescence detector	Fatty acids need to be derivatized Very high sensitivity
[8]	RP Ascentis Express column (150 × 2.1 mm; 2.7 µm)	Triple quadrupole mass spectrometer-ESI	Molecule identity can be obtained Run time of 20 min May need UHPLC chromatographic system capable to undergo high back pressures
[9]	Acclaim C30 column (250 × 3 mm; 3 µm)	Corona ultra RS Charged Aerosol Detector.	Poor resolution More sensitive than ELSD

(Millipore, Molsheim, France). All solvents were HPLC gradient grade and previously filtered on nylon membrane (0.45 µm). Methanol was obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Arachidic acid (C20:0), behenic acid (C22:0), palmitic acid (C16:0) and lauric acid (C12:0) were purchased from TCI (Antwerp, Belgium). Heptadecanoic acid (C17:0), octanoic acid (C8:0), myristic acid (C14:0) and stearic acid (C18:0) were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Linoleic acid (C18:2) was purchased from Acros Organics (Illkirch, France), oleic acid (C18:1) was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Docosahexaenoic acid (C22:6) was purchased from Larodan (Limhamn, Sweden). Sunflower Lecithin (Lipoid H 100) was kindly donated by Lipoid (Ludwigshafen, Germany).

2.2. Reversed-Phase HPLC Assays

After dissolution of FFAs in a methanol:TFA (0.05%) solution, 5 µL of sample were injected in an Agilent HPLC system 1260 Infinity (Les Ulis, France) equipped with a quaternary pump, an online degasser, an autosampler, a UV detector set at 205 nm and an ELSD (PL-ELS 2100, Varian, Palo Alto, California). Column temperature control was operated by a specific thermostated module working with Peltier heating and cooling. Temperature accuracy given by

Agilent is of 0.8°C. Separation was performed with an Agilent Poroshell 120 EC-C18 column (50 × 4.6 mm, 2.7 µm). To achieve separation, a binary solvent gradient elution was optimized. Solvents were water with 0.05% TFA (solvent A) and methanol with 0.05% TFA (solvent B). The gradient was programmed as follows: 0 - 3.5 min, isocratic 87% B; 3.5 - 7.5 min, linear gradient elution, 87% - 98% B; 7.5 - 9.6 min, isocratic 98% B; 9.6 - 9.7 min, linear gradient elution, 98% - 87% B; 9.7 - 11.5 min, isocratic 87% B. Solvent flow rate was set at 1 mL/min.

2.3. Method Validation

Method validation was conducted according to ICH guidelines [10]. In this frame, the reliability of the HPLC method was established through its specificity, calibration, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, precision, robustness and carry-over

2.3.1. Specificity

Sunflower lecithin, that does not contain FFAs, was chosen as the lipid matrix to investigate specificity.

Standard FFA solution (2 mM) was analysed in the absence and in the presence of sunflower lecithin (20 mM) to ensure that FFAs and lecithin would not interfere with each other. Results were analyzed considering the peak area and the retention time (RT) of each FFA.

2.3.2. Calibration

Stock solutions of each FFA (100 mM) were prepared separately in a methanol:TFA (0.05%) solution. To plot the calibration curves, a fatty acid mixture solution (10 mM of each FFA) was prepared by mixing together 200 µL of each FFA from stock solutions. Calibration curves were established according to peak area as a function of each FFA concentration (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 and 6 mM) prepared in a methanol:TFA (0.05%) solution.

2.3.3. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

For each FFA, the values of LOD and LOQ were determined using Agilent Chemstation Software. They correspond to the lowest concentrations giving rise to a particular signal-to-noise ratio. A signal-to-noise ratio between 3 or 2:1 is generally considered acceptable for estimating LOD and for the LOQ a typical signal-to-noise is 10:1.

2.3.4. Accuracy

The accuracy of an analytical method expresses the closeness between the expected value and the value found. It is expressed by calculating for each component the percent of recovery (% R). In this case, to evaluate the accuracy of the proposed method, successive analyses (n = 6) of 2 mM standard FFA solution spiked in sunflower lecithin were carried out. Results were determined using the following formula:

$$\% \text{ Recovery} = (\text{measured concentration} / \text{spiked concentration}) \times 100$$

2.3.5. Precision

Precision was evaluated in terms of repeatability and reproducibility. Intra-assay precision (repeatability) and inter-assay precision (reproducibility) were calculated respectively after six consecutive runs or six consecutive preparations for each studied FFA.

2.3.6. Robustness

Three selected analytical parameters (percentage of water in the mobile phase, flow rate and column temperature) were changed one by one and their effect was observed on each FFA. All assays were performed in triplicate and results were expressed as percentages of recovery.

2.3.7. Carry-Over

Carry-over was assessed by sequential injections of blank samples after a sample containing twice the amount of FFAs found in the highest points of the calibration curves.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of ELSD Parameters

Working with ELSD requires optimization of two parameters: i) drift tube and nebulization temperature, ii) nebulizing gas flow rate [11].

3.1.1. Optimization of Drift Tube and Nebulization Temperature

According to manufacturer recommendations, drift tube and nebulizer temperatures should be similar and should not exceed solvent boiling point (70°C for methanol). Thus, the temperature range chosen for this study was from 25°C to 55°C. With increasing temperatures, an increase in peak area is observed, more due to a peak broadening than to a peak height increase. However, peak height is an important factor since peaks insufficiently high do not emerge from the baseline and therefore molecules cannot be detected. Peak symmetry is another criterion to take into account since a good symmetry indicates the absence of co-elution. In this frame, a peak symmetry in the range of 0.8 - 1.2 is considered as suitable. Thus, peak height and symmetry are used to determine the best setting. For optimization of drift tube and nebulization temperature, nebulizing gas flow rate was kept constant at 1.1 Standard Liter per Minute (SLM).

Presumably due to its short chain length, octanoic acid is not detected by ELSD in the concentration range studied whatever the temperature. Bravi *et al.* [12] showed that ELSD is only suitable for the analysis of C12 - C22 FFAs since they are not evaporated at this drift tube temperature. FFAs with shorter chain length are not detected since they have been evaporated totally or partially with the solvent. This is the main drawback when working with ELSD.

As seen on **Figure 1**, peak height increases when the temperature rises up from 25°C to 55°C except for four fatty acids: lauric acid (C12:0), myristic acid (C14:0), arachidic acid (C20:0) and behenic acid (C22:0). The behaviors of arachidic and behenic acids are quite intriguing and the attempts of explanation

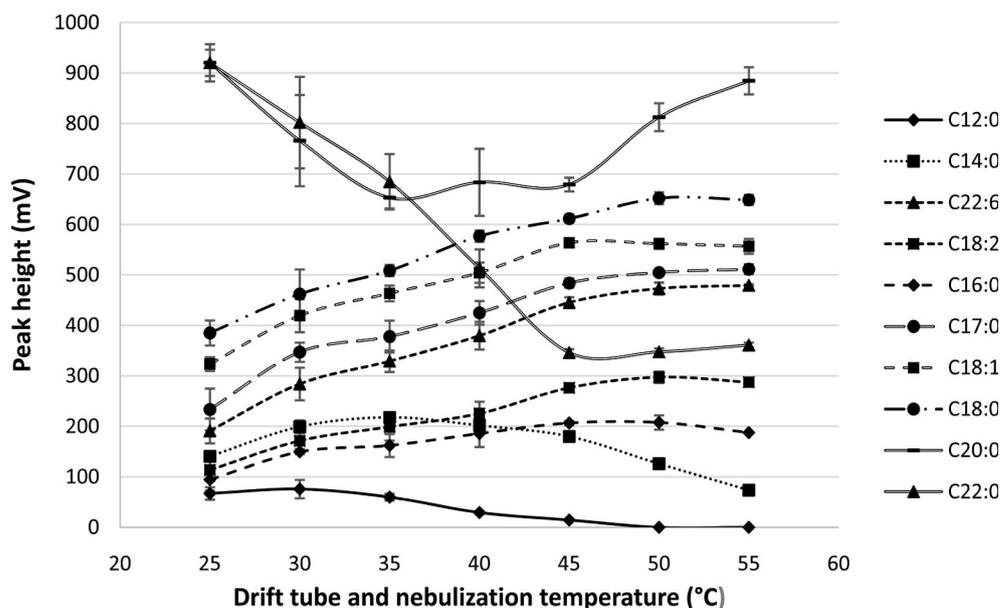


Figure 1. Effect of drift-tube and nebulization temperature on peak height obtained with a column temperature of 25°C and a nitrogen flow rate of 1.1 SLM.

rather presumptive. Nevertheless this is not really crippling to consider an optimized setting for drift tube and nebulization temperature.

Above 50°C, lauric acid is no longer detected. However, up to 35°C, peak height is stable for lauric and myristic acid. As the peak height remains high for arachidic and behenic acids despite a decrease, it appeared that the temperature of 35°C constituted the best compromise for an optimal detection of the 10 considered FFAs. It has also been checked that all FFAs have a peak symmetry value above 0.8 or very close to 0.8 at 35°C. Drift tube and nebulization temperature was thus set at 35°C.

3.1.2. Nitrogen Flow Rate Adjustment

Influence of nitrogen flow rate was then studied with drift tube and nebulization temperature set at 35°C. According to manufacturer recommendations, nitrogen flow rate should be set between 1 to 2 SLM. Nebulization gas flow rate determines the size of droplets formed during nebulization. The highest signal is generally obtained with the lowest gas flow rate [13].

In terms of peak height, the best ELSD response is at 1.1 SLM for all FFAs except for C12:0, C20:0 and C22:0 (Figure 2). As far as C12:0 is considered, increasing the flow rate above 1.1 SLM does not significantly improve peak height. In case of C20:0 and C22:0, the response, even though not the highest at 1.1 SLM, is high. Hence, the flow rate was kept at 1.1 SLM.

3.2. Optimization of Column Temperature

According to manufacturer recommendations, column temperature and ELSD drift tube temperature have to be close. Nevertheless, the column temperature also affects efficiency of chromatographic separation and to optimize this para-

meter, theoretical plate number was considered. Indeed, the higher the theoretical plate number, the better the resolution.

As seen on **Figure 3**, efficiency decreases when the temperature rises up ex-

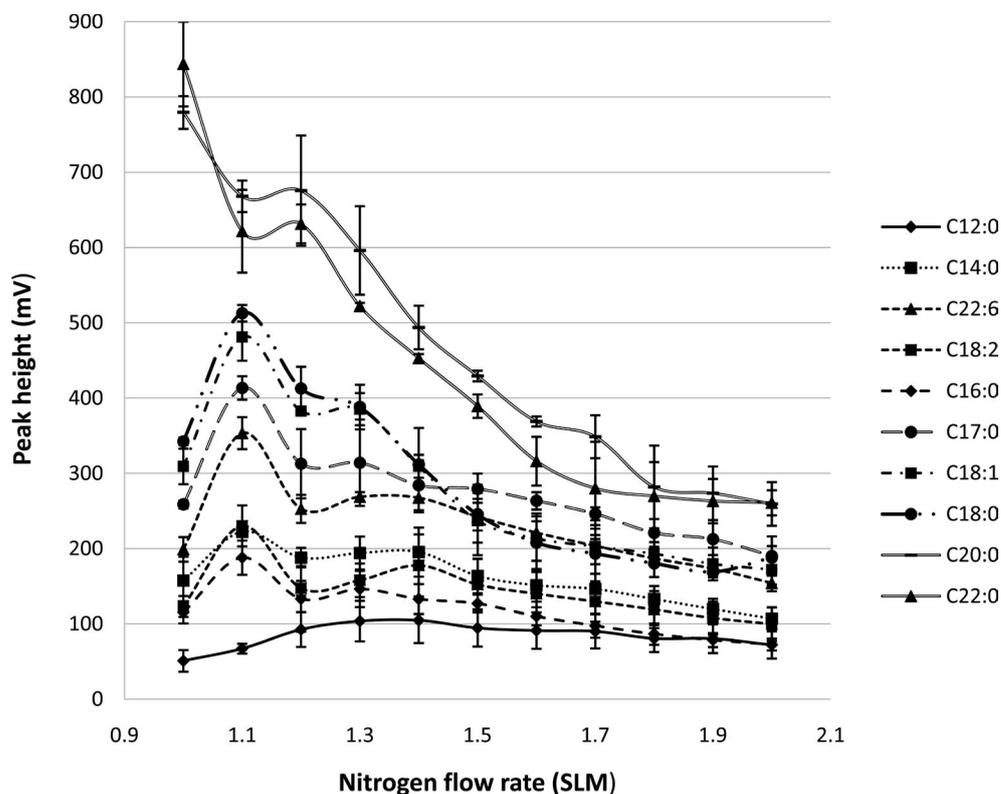


Figure 2. Influence of nitrogen flow rate on peak height obtained with a column temperature of 25°C and a drift tube and nebulization temperature of 35°C.

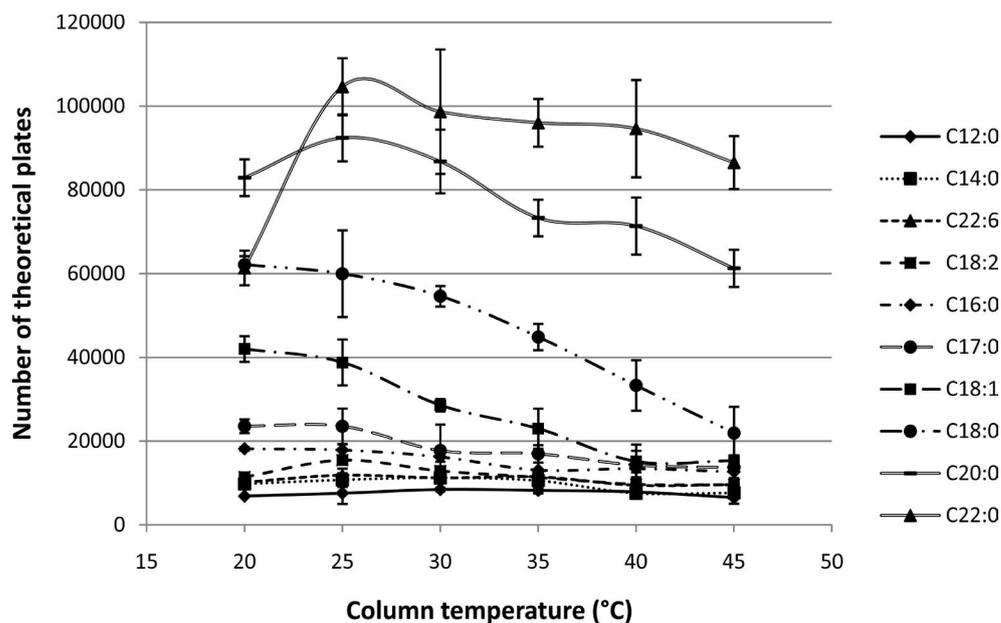


Figure 3. Influence of column temperature on theoretical plate number obtained with a drift tube and nebulization temperature of 35°C and a nitrogen flow rate of 1.1 SLM.

cept for C20:0 and C22:0 which have a lower theoretical plate number at 20°C than at 25°C. To choose between 20 and 25°C, the peak resolution between the two worst separated component, C18:2 and C22:6, was considered. Since no difference is observed between the two temperatures, column temperature will be set at 25°C to be closest to the drift tube temperature.

3.3. Fatty Acid Separation

The chromatographic separation of 10 FFAs using ELSD is shown on **Figure 4**. The elution order is: C12:0, C14:0, C22:6, C18:2, C16:0, C17:0, C18:1, C18:0, C20:0 and C22:0. FFAs were separated to the baseline and eluted as sharp peaks within 10.5 min. ELSD chromatogram allows identification of all FFA standards with good resolution and without deflected baseline due to gradient elution.

These results have been in part obtained thanks to the addition of TFA in the mobile phase leading to ionization of the carboxylic group therefore increasing molecule polarity and allowing a better resolution and a faster separation. Due to the use of a core-shell C18 column (50 × 4.6 mm; 2.7 μm), the run time is also very short regarding the number of FFAs analyzed and shorter than those obtained in previous studies.

For example, Ilko *et al.* [14] separated 7 FFAs in 15 min on Kinetex C18 column (100 × 3.0 mm; 2.6 μm) with an acetonitrile:water (0.05% formic acid) eluent. Separation of 5 plasmatic FFAs was also performed with an elution gradient in only 10 min with ethanol and water but a poor resolution was observed [15].

UV chromatograms only show unsaturated FFAs like C18:1, C18:2, C22:6 (data not shown). Moreover, UV detection leads to a slight deviation of the baseline. This is due to the increase in the percentage of methanol in the elution solvent which absorbs at 205 nm. These results clearly show the advantages of ELSD detection over UV detection.

3.4. Method Validation

3.4.1. Specificity

Specificity was assessed by analyzing a sample of sunflower lecithin supplemented with a standard FFA solution. Since a good separation is observed be-

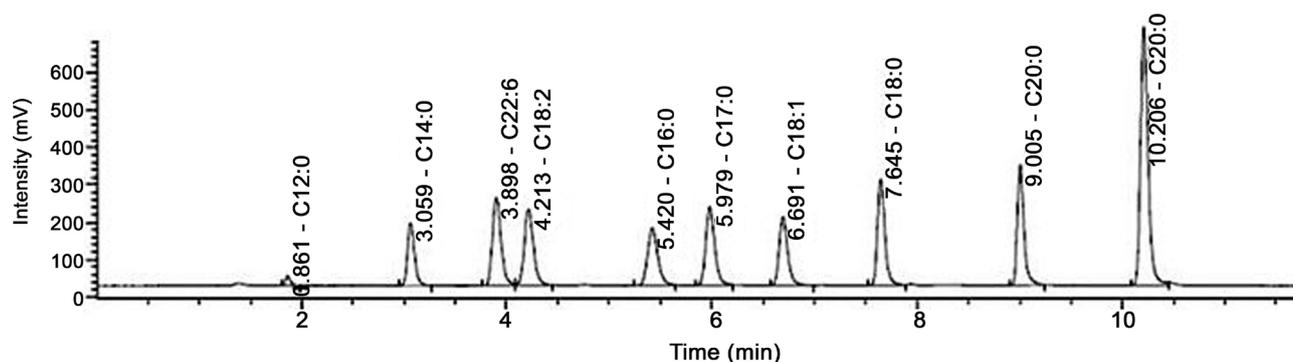


Figure 4. HPLC-ELSD chromatogram of a standard mixture of 10 FFAs (2 mM). Injection volume: 5 μL. Solvent flow rate: 1 mL/min.

tween all components (data not shown), the method can be considered specific.

3.4.2. Calibration

Since ELSD response depends on the analyzed molecules, it is necessary to establish calibration curves for each FFA studied.

As seen on **Figure 5**, calibration curves are non-linear and the empirical model that best describes this response is a polynomial model [16]:

$$\text{Peak area} = a \times (\text{concentration})^b$$

Polynomial regression of calibration curves was performed with Excel program giving a and b values for each FFA. For each standard, calibration curve shows a r^2 value above 0.9975 (**Table 2**). It can also be seen that high molecular weight molecules saturate the ELSD with lower concentrations than those of smaller size.

3.4.3. LOD and LOQ

Limits of quantification and detection were determined according to a signal to noise approach. For fatty acids with a chain length of 14 or greater, satisfactory sensitivity is achieved with a LOQ value between 0.03 and 0.3 mM (**Table 2**). With shorter chains such as C12:0, volatility is more important and LOD and LOQ values increase considerably. Quantification of C12:0 requires an amount of at least 0.7 mM.

3.4.4. Accuracy

The results presented in **Table 2** show that the recovery values are between 95%

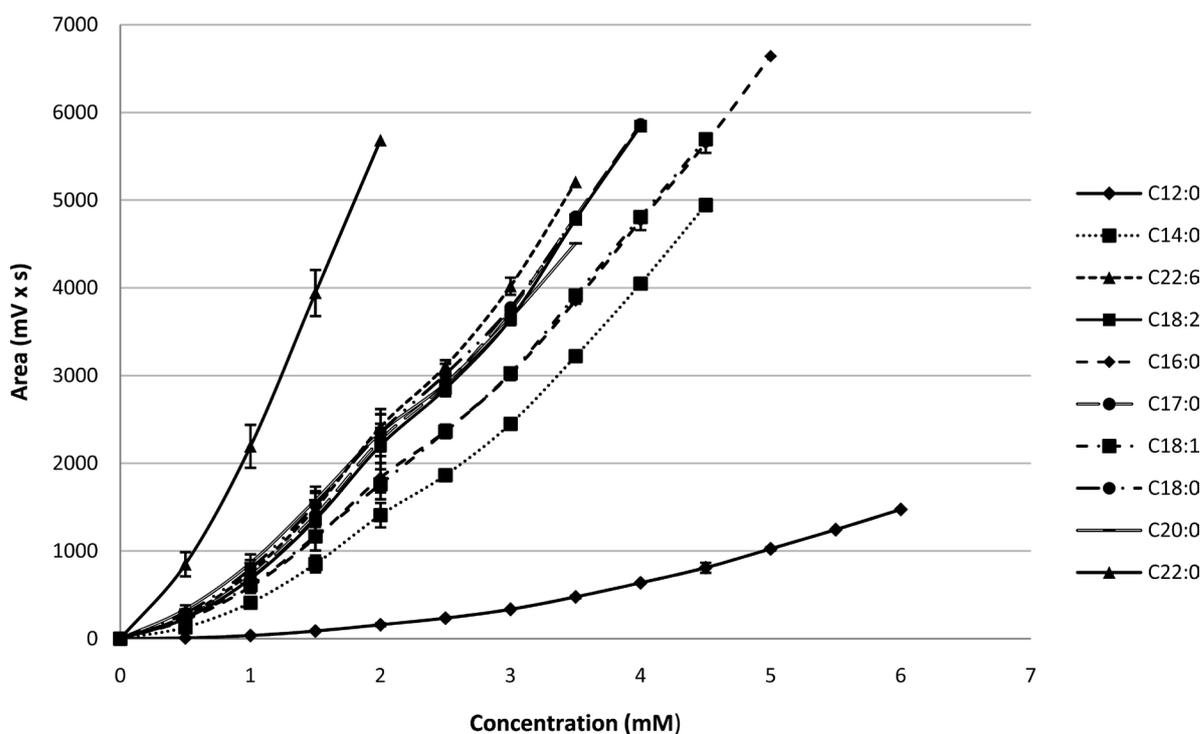


Figure 5. Calibration curves for the 10 studied FFAs.

and 99% for all FFAs except for C14:0 and C20:0 which show lower values of 89% and 81% respectively. These results indicate that the accuracy of the proposed method is acceptable.

3.4.5. Precision

Repeatability and reproducibility were investigated to evaluate the precision. Results are expressed as relative standard deviation (RSD%). RSD values do not exceed 1.5% for repeatability and 4.25% for reproducibility (**Table 2**).

3.4.6. Robustness

The results of robustness are presented in **Table 3**. Recovery rates vary between

Table 2. Calibration data, LOD, LOQ, accuracy and precision.

FFAs	t_R (min)	Regression equation	r^2	LOD (mM)	LOQ (mM)	Repeatability RSD (%) n=6	Reproducibility RSD (%) n = 6	Accuracy (%R)
C12:0	1.813	$y = 38.612x^{2.0221}$	0.9994	0.5	0.7	1.50	4.25	95
C14:0	2.92	$y = 417.72x^{1.6449}$	0.9990	0.09	0.3	1.50	1.97	89
C22:6	3.615	$y = 768.33x^{1.5422}$	0.9986	0.03	0.1	1.15	1.44	96
C18:2	3.962	$y = 695.04x^{1.5482}$	0.9986	0.03	0.3	0.92	1.89	98
C16:0	5.049	$y = 609.37x^{1.4852}$	0.9992	0.07	0.3	1.68	1.94	95
C17:0	6.411	$y = 726.24x^{1.5232}$	0.9985	0.07	0.09	1.41	1.05	99
C18:1	5.646	$y = 645.19x^{1.4391}$	0.9991	0.01	0.09	1.38	1.73	99
C18:0	7.428	$y = 808.74x^{1.4435}$	0.9982	0.02	0.1	0.78	1.62	97
C20:0	8.871	$y = 871.02x^{1.3356}$	0.9975	0.01	0.03	1.05	1.46	81
C22:0	10.069	$y = 2222x^{1.3939}$	0.9998	0.01	0.03	0.82	2.32	98

Table 3. Robustness assays.

	Mobile phase flow rate (mL/min)		Column temperature (°C)		% solvent A at gradient start		Method conditions
	0.9	1.1	24	26	12	14	
<i>% Recovery</i>							
C12:0	96	101	96	99	87	109	100
C14:0	97	99	100	101	91	109	100
C22:6	103	102	100	101	88	111	100
C18:2	101	101	100	102	90	114	100
C16:0	98	93	103	96	106	99	100
C17:0	105	96	99	97	107	90	100
C18:1	100	99	106	99	101	90	100
C18:0	102	100	101	99	105	94	100
C20:0	102	100	103	102	101	99	100
C22:0	103	102	102	99	103	92	100
<i>Resolution (linoleic-docosahexaenoic acid)</i>							
	1.75	1.86	2.15	1.91	1.89	2.15	2.02

87% and 114% when changing the percentage of water in the mobile phase. They vary between 93% and 105% when changing column temperature and between 96% and 106% for flow rate variation. The method was found to be robust when column temperature and flow rate were altered but the percentage of water in the mobile phase is a critical parameter that should be carefully controlled. It can also be seen that there is no significant change in the resolution of the two critical peaks of C22:6 and C18:2 which stays above the critical value of 1.5.

3.4.7. Carry-Over

No signal is observed in the blank solutions after the injection of twice the amount of FFAs used for the highest points of the calibration curves. This confirms the absence of memory effect in the chromatographic runs.

4. Conclusions

The HPLC method described in this paper allows the rapid separation of 10 FFAs from 12 to 22 carbon chain length including unsaturated FFAs within 10.5 min without baseline drift. Easy to implement, this method was also shown to be robust, accurate and sensitive with low LOD and LOQ values. Actually, greater sensitivity can be obtained with other methods, however they require either time consuming pre-analytical steps such as a fluorescence derivatization, or much more expensive equipment than ELSD (**Table 1**).

Finally, compared to existing protocols, the proposed method seems to combine numerous advantages making it particularly suitable for determination and quantification of FFAs.

Acknowledgements

This work was financially supported by “Laval Agglomération” and the “Conseil Départemental de la Mayenne”. The authors also wish to acknowledge LIPOID (Ludwigshafen, Germany) for providing sunflower lecithin. The authors are grateful to Nathalie Péan for English proofreading.

References

- [1] Schreiner, M. (2005) Quantification of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids by Gas Chromatography: Evaluation of Factors Affecting Accuracy. *Journal of Chromatography A*, **1095**, 126-130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.104>
- [2] Chen, S.-H. and Chuang, Y.-J. (2002) Analysis of Fatty Acids by Column Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **465**, 145-155. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00095-8)
- [3] Lima, E.S. and Abdalla, D.S.P. (2002) High-Performance Liquid Chromatography of Fatty Acids in Biological Samples. *Analytica Chimica Acta*, **465**, 81-91. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00206-4)
- [4] Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T. and Zhang, H. (2014) Core-Shell Particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1357**, 36-52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.010>

- [5] De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., *et al.* (2013) Development of a HPLC-UV Method for the Quantitative Determination of Four Short-Chain Fatty Acids and Lactic Acid Produced by Intestinal Bacteria during *In Vitro* Fermentation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **80**, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.032>
- [6] Gerits, L.R., Pareyt, B. and Delcour, J.A. (2013) Single Run HPLC Separation Coupled to Evaporative Light Scattering Detection Unravels Wheat Flour Endogenous Lipid Redistribution during Bread Dough Making. *LWT - Food Science and Technology*, **53**, 426-433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.015>
- [7] Zhang, S., You, J., Zhou, G., Li, C. and Suo, Y. (2012) Analysis of Free Fatty Acids in *Notopterygium forbesii* Boiss by a Novel HPLC Method with Fluorescence Detection. *Talanta*, **98**, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.052>
- [8] Della Corte, A., Chitarrini, G., Di Gangi, I.M., Masuero, D., Soini, E., Mattivi, F., *et al.* (2015) A Rapid LC-MS/MS Method for Quantitative Profiling of Fatty Acids, Sterols, Glycerolipids, Glycerophospholipids and Sphingolipids in Grapes. *Talanta*, **140**, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.003>
- [9] Loughrill, E. and Zand, N. (2016) An Investigation into the Fatty Acid Content of Selected Fish-Based Commercial Infant Foods in the UK and the Impact of Commonly Practiced Re-Heating Treatments Used by Parents for the Preparation of Infant Formula Milks. *Food Chemistry*, **197**, Part A, 783-789.
- [10] ICH Guideline (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1).
- [11] Webster, G.K., Jensen, J.S. and Diaz, A.R. (2004) An Investigation into Detector Limitations Using Evaporative Light-Scattering Detectors for Pharmaceutical Applications. *Journal of Chromatographic Science*, **42**, 484-490. <https://doi.org/10.1093/chromsci/42.9.484>
- [12] Bravi, E., Perretti, G. and Montanari, L. (2006) Fatty Acids by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-Scattering Detector. *Journal of Chromatography A*, **1134**, 210-214. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.007>
- [13] Zhao, J., Li, S.P., Yang, F.Q., Li, P. and Wang, Y.T. (2006) Simultaneous Determination of Saponins and Fatty Acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection and Pressurized Liquid Extraction. *Journal of Chromatography A*, **1108**, 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.104>
- [14] Ilko, D., Braun, A., Germershaus, O., Meinel, L. and Holzgrabe, U. (2015) Fatty Acid Composition Analysis in Polysorbate 80 with High Performance Liquid Chromatography Coupled to Charged Aerosol Detection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **94**, 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.11.018>
- [15] Kotani, A., Fuse, T. and Kusu, F. (2000) Determination of Plasma Free Fatty Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, **284**, 65-69. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4682>
- [16] Deschamps, F.S., Baillet, A. and Chaminade, P. (2002) Mechanism of Response Enhancement in Evaporative Light Scattering Detection with the Addition of Triethylamine and Formic Acid. *The Analyst*, **127**, 35-41. <https://doi.org/10.1039/b108810f>

Titre : Synthèse enzymatique de phospholipides structurés riches en DHA

Mots clés : Acidolyse, Estérification, Lipases, Acide docosahexaénoïque, Plan d'expériences, Phospholipides structurés

Résumé : Ce travail étudie l'obtention de phospholipides structurés enrichis en DHA et en acide caprylique (PC DHA-C8) par voie enzymatique. Deux voies de synthèse sont étudiées, l'acidolyse et l'estérification. Suite à un criblage enzymatique, la lipase retenue pour les deux voies de synthèse est TL-IM issue de *Thermomyces lanuginosa*. Une optimisation des paramètres de la réaction d'acidolyse a été réalisée entre l'acide caprylique (C8:0) et la phosphatidylcholine de tournesol (PC) par le biais d'un plan d'expériences. Les conditions optimales déterminées sont une température de 38°C, une activité de l'eau de 0,7, une quantité d'enzyme de 15% de la masse en substrat ainsi qu'un rapport molaire C8:0/PC de 18. Ces conditions ont ensuite été utilisées pour l'acidolyse de phospholipides microalgues riches en DHA issus de la microalgue

Tisochrysis lutea afin d'obtenir de la PC DHA C8. Les résultats n'ont pas été concluants. L'autre voie de synthèse étudiée est l'estérification par des lipases de la GPC, de l'acide caprylique et du DHA en milieu fondu. Cette réaction a été optimisée par la technique du pas par pas. Les paramètres étudiés sont la température, la quantité d'enzyme, le rapport molaire GPC/C8:0/DHA et l'application d'un vide. Pour l'obtention de PC DHA-C8, il faut fixer chacun de ces paramètres respectivement de la sorte : 45°C, 20% d'enzyme, un rapport molaire de 1/3/15 et un vide de 100 mbar. La production de PC DHA-C8, bien qu'optimisée ne dépasse pas 2% de rendement. Cependant, durant cette expérience, il a été constaté une forte production de LPC DHA, atteignant 16% sans optimisation des paramètres de synthèse.

Title : Enzymatic synthesis of structured phospholipids rich in DHA

Keywords : Acidolysis, Esterification, Lipases, Docosahexaenoic acid, Experimental design, Structured phospholipids

Abstract : The enzymatic synthesis of structured phospholipids enriched in DHA and caprylic acid (PC DHA-C8) is studied. Two different ways are studied, acidolysis and esterification. An enzymatic screening led to the choice of the immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosa* (TL-IM) for the 2 reactions. Parameters of the acidolysis reaction between caprylic acid (C8:0) and sunflower phosphatidylcholine (PC) were optimized by means of an experimental design. The optimum conditions determined are a temperature of 38°C, an aw of 0.7, an amount of enzyme of 15% of the mass of substrate and a molar ratio of C8:0/PC of 18. These conditions were applied to the acidolysis of microalgal phospholipids rich in DHA, obtained from the caprylic acid and DHA is studied as a second reaction in a solvent-free medium.

This reaction has been optimized by studying each factor independently. The parameters studied are the temperature, the amount of lipase, the molar ratio GPC/C8:0/DHA and the use of reduced pressure. In order to obtain PC DHA-C8, each of these parameters are respectively set at: 45°C, 20% of enzyme, a molar ratio of 1/3/15 and a pressure of 100 mbar. The production of PC DHA-C8, although optimized, does not exceed a yield of 2%. However, during this experiment, a high production of LPC DHA is observed, up to 16% without optimization of the synthesis parameter.